KIRROMYCINRESISTENTE ELONGATIONSFAKTOREN TU AUS PRODUZENTENSTÄMMEN VON ANTIBIOTIKA DER KIRROMYCINGRUPPE - VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZU STRUKTUR UND FUNKTION

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

CLAUDIA GLÖCKNER
aus Göppingen

1985

KIRROMYCINRESISTENTE ELONGATIONSFAKTOREN TU AUS PRODUZENTENSTÄMMEN VON ANTIBIOTIKA DER KIRROMYCINGRUPPE - VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZU STRUKTUR UND FUNKTION

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

CLAUDIA GLÖCKNER
aus Göppingen

1985

Tag der mündlichen Prüfung:		10. 5. 1985
Dekan	:	Prof. Dr. H.U. Seitz
1. Berichterstatter	:	Prof. Dr. H. Wolf
2. Berichterstatter	:	Prof. Dr. H. Zähner

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Wolf am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, seine Anregungen und seine Unterstützung danke ich Herrn Dr. Wolf sehr herzlich.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Zähner möchte ich mich für das Interesse an dieser Arbeit bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. W. Bessler, die mir bei der Herstellung von Antiserum behilflich waren.

Allen Mitarbeitern der Lehrbereiche Mikrobiologie I und II danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Abkürzungen

AA-tRNA	Aminoacyl-Transfer-Ribonukleinsäure
ADP	Adenosin 5'-diphosphat
AH-	Aminohexyl-
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
BAEE	Nα-Benzoyl-L-arginin-äthylester-HCl
cpm	Impulse pro Minute
CTP	Cytidin 5'-triphosphat
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DNase	Desoxyribonuklease
$E_x^{y\%}$	Extinktion einer y %igen Lösung bei x nm in einer Zelle mit der Dicke 1 cm
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EF	Elongationsfaktor
GDP	Guanosin 5'-diphosphat
GDPCP	Guanylyl(β,γ-methylen)-diphosphonat
GTP	Guanosin 5'-triphosphat
MIC	minimale Hemmkonzentration
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NADH	Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid (reduzierte Form)
NEM	N-Ethylmaleimid
Phe	L-Phenylalanin
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
Poly(U)	Polyuridylsäure
ppGpp	Guanosin 3'-diphosphat 5'-diphosphat
rpm	Umdrehungen pro Minute
S.	Streptomyces
S 30	Überstand nach Zentrifugation bei 30 000 x g
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sv.	Streptoverticillium
TCA	Trichloressigsäure
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanyl-Chloromethylketon
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit (Enzymeinheit)

UTP Uridin 5'-triphosphat

Weitere Abkürzungen sind im Text erklärt.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	10
II.1.	Chemikalien, Enzyme und sonstiges Verbrauchsmaterial	10
II.2.	Nährmedien und Puffer	11
II.3.	Versuchsorganismen	12
II.4.	Analytische Methoden	13
II.5.	In vivo Versuche	14
II.6.	Isolierung und Reinigung der Elongationsfaktoren	15
II.7.	Testsysteme zum Nachweis und zur Charakterisierung von EF-Tu	18
III.	Ergebnisse	27
III.1.	Untersuchungen an EF-Tu aus Actinomyceten im Vergleich zu EF-Tu aus E.coli	27
III.2.	Morphologische Aspekte; zeitlicher Verlauf von Proteinsynthese und Antibiotikaproduktion	32
III.3.	Reinigung von EF-Tu aus Sv.mobaraense, S.cinnamomeus und S.lactamdurans	35
III.4.	Charakterisierung von EF-Tu aus Sv.mobaraense, S.cinnamomeus und S.lactamdurans	40
IV.	Diskussion	64
V.	Zusammenfassung	75
VI.	Literatur	76
VII.	Anhang	93

I. EINLEITUNG

Die Entdeckung des Elongationsfaktors Tu geht in die sechziger Jahre zurück, als Lipmann und seine Mitarbeiter zeigen konnten, daß zur Translation synthetischer mRNA an Ribosomen zwei lösliche, cytoplasmatische Proteine nötig sind. Eines der beiden Proteine wurde, da es für den Transport von AA-tRNA zum Ribosom verantwortlich ist, mit EF-T (Transfer) bezeichnet (ALLENDE et al., 1964; NISHIZUKA und LIPMANN, 1966). Die nähere Charakterisierung ergab später, daß es sich hierbei um einen Komplex aus zwei Proteinen handelt, die aufgrund ihrer Stabilität als EF-Tu (unstable) und EF-Ts (stable) benannt wurden (LUCAS-LENARD und LIPMANN, 1966).

Der Elongationsfaktor Tu ist ein Protein, das in großer Menge in der Bakterienzelle vorkommt. Die Angaben für die E.coli-Zelle schwanken zwischen 5 % des Gesamtproteins (JACOBSON und ROSENBUSCH, 1976; JACOBSON et al., 1976) und ungefähr 6 % bezogen auf den Proteingehalt eines 100 000 g-Überstandes (FURANO, 1975).

JASKUNAS et al. (1975) zeigten, daß EF-Tu aus E.coli durch zwei autonome Gene codiert wird, die mit tuf A und tuf B bezeichnet wurden. Auch andere gram-negative Bakterien weisen zwei tuf-Gene auf (FILER und FURANO, 1981; TIBONI et al., 1984). Bei den bisher untersuchten gram-positiven Bakterien liegen starke Hinweise für nur ein tuf-Gen vor (SMITH und PARESS, 1978; FILER und FURANO, 1981).

FILER und FURANO (1980) fanden Sequenzhomologien bei tuf-Genen verschiedener Bakterien, die taxonomisch weit auseinanderstehen. Weitere Untersuchungen brachten die Autoren zu der Ansicht, daß diese gemeinsamen tuf-Sequenzen nicht durch chromosomalen Transfer zwischen den Prokaryonten im Laufe ihrer Entwicklung aus einem gemeinsamen Progenoten zu erklären, sondern vielmehr das Ergebnis starken selektiven Druckes sind (FILER et al., 1981).

Sowohl das tuf A-Gen (SHIBUYA et al., 1979), als auch das tuf B-Gen aus E.coli (MIYAJIMA et al., 1979) wurden kloniert und in vivo zur Expression gebracht (MIYAJIMA und KAZIRO, 1980).

Hinweise, daß sich die Genprodukte der beiden tuf-Gene nur geringfügig unterscheiden (FURANO, 1977), konnten mit der vollständigen Aufklärung der Aminosäuresequenz von EF-Tu durch ARAI et al. (1980) und JONES et al. (1980) bestätigt werden. Lediglich die carboxyterminale Aminosäure Glycin des tuf A-Genprodukts ist beim tuf B-Genprodukt durch einen Serinrest ersetzt.

Zusätzlich zu seiner wichtigen Aufgabe in der Proteinbiosynthese wurden wei-

tere Funktionen von EF-Tu in der E.coli-Zelle gefunden:
1972 identifizierten BLUMENTHAL et al. die Untereinheiten III und IV der RNA-Replicase des E.coli-Phagen Qß als EF-Tu und EF-Ts. Es wurde später gezeigt, daß die beiden Proteine nur während der Initiation der RNA-Kette gebraucht werden (LANDERS et al., 1974).
TRAVERS (1973) postulierte aufgrund seiner Untersuchungen, daß EF-Tu zusammen mit EF-Ts und ppGpp bei der Transkription von ribosomaler RNA eine regulatorische Rolle übernimmt. Dem widersprachen allerdings andere Ergebnisse (VAN OOYEN et al., 1976), die daraufhindeuteten, daß ppGpp allein diese Regulation gewährleistet. BIEBRICHER und DRUMINSKI (1980) entwickelten ein Modell zur Regulation der RNA-Synthese, in dem EF-Ts eine wichtige Funktion zukommt. Nach deren Meinung scheinen in vivo verschiedene Kontrollmechanismen nebeneinander denkbar, so daß sich die unterschiedlichen Vorstellungen nicht zwingend widersprechen müssen.
Eine weitere Eigenschaft von EF-Tu besteht in seiner Assoziation mit der inneren Zellmembran bei E.coli (WEISSBACH et al., 1969; JACOBSON und ROSENBUSCH, 1976). Diese Tatsache, sowie die Fähigkeit von EF-Tu zur Polymerisation zu Filamentbündeln und Bindung an DNase I (BECK et al., 1978) zusammen mit anderen Eigenschaften, die auf einen evolutionären Zusammenhang mit Actin schließen lassen (ROSENBUSCH et al., 1976), ließen vermuten, daß EF-Tu möglicherweise eine Komponente eines bakteriellen Cytoskeletts darstellt (BECK, 1979). Immunocytochemische Untersuchungen zur Lokalisierung von EF-Tu in der E.coli-Zelle (SCHILSTRA et al., 1984) können diese Annahme nicht bestätigen. Schon 1978 wurde von WURTZ et al. aufgrund ihrer Versuche die Verwandtschaft mit Actin als sehr weitläufig, wenn überhaupt vorhanden, bezeichnet. Auch die Ergebnisse von LEBERMAN (1984), der keinen Hinweis auf eine Wechselwirkung zwischen EF-Tu und DNase I findet, sprechen gegen eine Verwandtschaft von EF-Tu und eukaryontischem Actin.
Bevor auf die wichtige Funktion von EF-Tu bei der Proteinbiosynthese näher eingegangen wird, sollen noch kurz einige strukturelle Eigenschaften des Proteins erwähnt werden. Wie schon in den bisherigen Ausführungen beziehen sich auch diese Aussagen auf den aus E.coli isolierten Elongationsfaktor, der am besten untersucht ist.
Es handelt sich um ein monomeres Protein, das aus 393 Aminosäuren besteht, deren Sequenz vollständig aufgeklärt wurde (ARAI et al., 1980; JONES et al., 1980). Die Aminosäurezusammensetzung führt zu einem Molekulargewicht von 43 225 für EF-Tu mit carboxyterminalem Serin, was dem tuf B-Genprodukt entspricht. Die Polypeptidkette enthält drei Cysteinreste, wobei zwei der Sulf-

hydrylgruppen an der Oberfläche lokalisiert sind und eine wichtige Rolle bei der Nukleotidbindung bzw. der Bindung der AA-tRNA spielen (MILLER et al., 1971; ARAI et al., 1974a). Letztere scheint auch an der Wechselwirkung von EF-Tu mit dem Ribosom beteiligt zu sein (KAWAKITA et al., 1974). Die dritte SH-Gruppe wird nur nach vollständiger Denaturierung des Proteins für SH-Gruppenreagenzien zugänglich. Ihr konnte bis jetzt keine Funktion zugeschrieben werden. Als gesichert gilt, daß die reaktiven SH-Gruppen für das Funktionieren von EF-Tu essentiell sind, unsicher ist, ob sie direkt an der Bindung der Reaktionspartner beteiligt sind (WITTINGHOFER und LEBERMAN, 1979).
Als wichtig für die Funktionen von EF-Tu werden auch Argininreste (MARSCHEL und BODLEY, 1980; KRAAL und HARTLEY, 1978), sowie Histidylgruppen (JONAK und RYCHLIK, 1980; DUFFY et al., 1981) diskutiert.
Untersuchungen zur dreidimensionalen Struktur von trypsinisiertem EF-Tu·GDP wurden von drei Arbeitsgruppen durchgeführt (KABSCH et al., 1977; MORIKAWA et al., 1978; JURNAK et al., 1980; RUBIN et al., 1981). Von nativem EF-Tu·GDP konnten keine genügend großen Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse hergestellt werden. Die Arbeitsgruppen kommen aufgrund ihrer Ergebnisse zu einem Zwei-Domänen-Modell für EF-Tu. Beide Domänen sind über eine kurze Polypeptidkette miteinander verknüpft. Die große Domäne besteht aus sechs α-Helices und sechs ß-Faltblattsträngen, die kleine Domäne weist laut JURNAK et al. (1980) keine dieser Strukturen, nach RUBIN et al. (1981) möglicherweise ß-Stränge, aber keine α-Helices auf. Ein Modell, das aus drei Domänen besteht, schlagen DUISTERWINKEL et al. (1984) vor. Ihre Domäne 1 entspricht der großen Domäne (dichte oder Kopfdomäne), die Domänen 2 und 3 entsprechen der kleinen Domäne (lockere oder Schwanzdomäne). Alle Autoren lokalisieren die Nukleotidbindungsstelle auf der großen Domäne (Domäne 1). Die AA-tRNA scheint über eine große Fläche mit EF-Tu in Kontakt zu treten, die von Domäne 1 bis 3 reicht (ANTONSSON und LEBERMAN, 1984).
Nachdem die strukturellen Eigenschaften des Proteins näher vorgestellt wurden, soll nun die Aufgabe von EF-Tu während der Elongationsphase der Proteinbiosynthese erörtert werden.
Die Elongation gliedert sich in die drei Schritte AA-tRNA-Bindung, Transpeptidierung und Translokation, wobei EF-Tu nur am ersten Schritt beteiligt ist. EF-Tu vermittelt die Bindung der AA-tRNA an die A-Stelle des Ribosoms. Der Faktor durchläuft dabei Reaktionen, die als Zyklus zusammengefaßt dargestellt werden können (Abbildung 1). Die Bindung der AA-tRNA erfolgt nur an EF-Tu·GTP, nicht aber an EF-Tu·GDP (ERTEL et al., 1968 und 1968a; RAVEL et al., 1968). Dies galt bis vor kurzem als Tatsache. PINGOUD et al. konnten 1982 dann auch

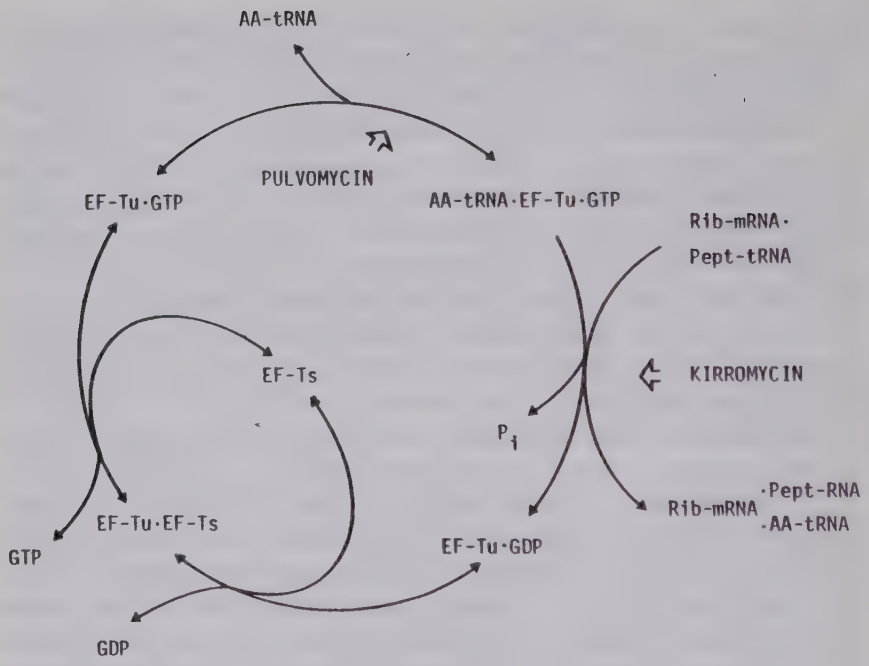


Abb. 1: EF-Tu-abhängige Reaktionen während der Elongationsphase der Proteinbiosynthese

eine Bindung der AA-tRNA in Gegenwart von GDP an EF-Tu nachweisen. Dieser Komplex wird allerdings unter physiologischen Bedingungen nicht gebildet, da hier ein großer Überschuß von GTP über GDP vorliegt. PINGOUD und URBANKE (1980) stellten bei E.coli für die verschiedenen natürlich vorkommenden AA-tRNA-Arten unterschiedliche Affinitäten zu EF-Tu fest, zeigen aber, daß dadurch keine AA-tRNA bevorzugt zum Ribosom transportiert wird, da in der Zelle genügend große Mengen an EF-Tu vorhanden sind, um alle AA-tRNAs zu binden. Der ternäre Komplex aus EF-Tu, GTP und AA-tRNA bindet nun an die A-Stelle des Ribosoms, dessen P-Stelle mit einer Peptidyl-tRNA besetzt ist. Dies entspricht dem allgemein anerkannten Zwei-Bindungsstellen-Modell für das Ribosom. Die Diskussion über eine dritte Bindungsstelle, die E-Stelle (RHEINBERGER et al., 1981 und 1983; GRAJEVSKAJA et al., 1982), ist in diesem Zusammenhang unerheblich, da sie keine Auswirkung auf die Beschreibung der Funktion von EF-Tu hat.

Die Bindung der "richtigen" AA-tRNA ans Ribosom erfolgt über Codon-Anticodon-Wechselwirkung mit der mRNA. Solange die AA-tRNA an EF-Tu·GTP gebunden ist, kann keine Transpeptidierung stattfinden. Zur Entfernung von EF-Tu·GTP ist die Hydrolyse des GTP nötig, erst dann kann der Faktor als EF-Tu·GDP das Ribosom verlassen. Bevor der Elongationsfaktor eine neue AA-tRNA binden kann, muß er wieder zu EF-Tu·GTP umgewandelt werden. Dies geschieht mit Hilfe von EF-Ts (MILLER und WEISSBACH, 1969 und 1970). Da GDP eine große Affinität zu EF-Tu besitzt, kann es nicht ohne weiteres durch GTP ersetzt werden (MILLER et al., 1973; WITTINGHOFER et al., 1977). Der Vorgang wird über die Bildung eines labilen EF-Tu·GDP·EF-Ts-Komplexes bewerkstelligt (CHAU et al., 1981). Die Dissoziationsgeschwindigkeit für GDP wird dadurch erhöht, analog wird im entstehenden EF-Tu·EF-Ts-Komplex EF-Ts durch GTP ersetzt und EF-Tu·GTP steht für eine neue Runde des Elongationszyklus zur Verfügung.

Im Verlauf der Proteinbiosynthese tritt EF-Tu, wie gezeigt, mit zahlreichen Reaktionspartnern in Wechselwirkung. In einigen Fällen führt die Bindung zu Konformationsänderungen von EF-Tu, und diese sind unerläßlich für seine Funktion während der Elongation. Durch die Bindung von GTP anstelle von GDP wird eine solche Konformationsänderung induziert (CRANE und MILLER, 1974; ARAI et al., 1975 und 1976; OHTA et al., 1977; ARAI et al., 1977; WILSON et al., 1978). Sie wurde von den aufgeführten Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen. Nur in der durch GTP induzierten Konformation führt die Bindung der AA-tRNA zu einem für die weiteren Reaktionen brauchbaren ternären Komplex. Mit EF-Tu·GDP bildet die AA-tRNA keinen stabilen Komplex (SHULMAN et al., 1974; MILLER und WEISSBACH, 1974).

Eine veränderte Konformation von EF-Tu liegt auch bei der Bindung von EF-Ts (BLUMENTHAL et al., 1977), sowie im ternären Komplex vor (KRAAL und HARTLEY, 1978).

Beeinflussungen der Konformation werden ebenfalls durch die Bindung der Antibiotika Kirromycin und Pulvomycin erreicht. 1978 wurde basierend auf biochemischen Versuchen von WOLF et al. postuliert, daß Pulvomycin an EF-Tu eine EF-Tu·GDP-ähnliche, Kirromycin dagegen eine EF-Tu·GTP-ähnliche Konformation induziert, unabhängig davon, welches der beiden Nukleotide gebunden ist. RÖMER et al. (1981) lieferten durch NMR-Messungen weitere Bestätigung für diese Annahme.

Viele Antibiotika entfalten ihre hemmende Wirkung auf der Ebene der Proteinbiosynthese. Der überwiegende Anteil greift dabei direkt an den Ribosomen an. Antibiotika, die über eine Interaktion mit den Elongationsfaktoren wirken, sind nur wenige bekannt; einmal die Fusidinsäure, die an den Elongationsfak-

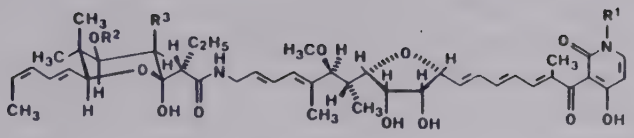
tor G bindet, zum zweiten die Stoffe der Kirromycingruppe, wozu Kirromycin und seine Derivate, sowie Pulvomycin gerechnet werden. Diese reagieren mit EF-Tu.

WOLF und ZÄHNER (1972) isolierten aus der Kulturflüssigkeit von S.collinus das Kirromycin, welches mit Mocimycin (VOS, 1972) aus S.ramocissimus identisch ist. In den kommenden Jahren wurden eine Reihe von Kirromycinderivaten beschrieben wie Aurodox (BERGER et al., 1972), Azdimycin (NIMECK et al., 1975), Efrotomycin (WAX et al., 1976), Dihydromocimycin (JONGSMA et al., 1977), Heneicomycin (ZIMMERMAN et al., 1979), Kirrothricin (THEIN-SCHRANNER et al., 1982) und Factumycin (GULLO et al., 1982). Einen umfassenden Überblick zu diesen Antibiotika geben die Artikel von PARMEGGIANI und SANDER (1980), sowie WOLF und FISCHER (1983). Beispiele von Strukturformeln einiger dieser Verbindungen sind in Abbildung 2 zu sehen.

Pulvomycin (ZIEF et al., 1957; ASSMANN und WOLF, 1979) kann aufgrund gewisser struktureller Ähnlichkeiten zur Kirromycingruppe gerechnet werden (WOLF et al., 1978). Es erwies sich als identisch mit Labilomycin (AKITA et al., 1963; SCHWARTZ et al., 1976) und wurde aus Kulturen von Sv.mobaraense bzw. S.albosporeus erhalten. Die Wirkungsweise von Pulvomycin besteht in einer Blockierung der Peptidelongation auf der Ebene der Bindung des ternären Komplexes ans Ribosom. Da Pulvomycin durch Bindung an EF-Tu eine EF-Tu·GDP entsprechende Konformation hervorruft, wird die Bildung des ternären Komplexes verhindert, es tritt Substratverarmung ein und damit eine Hemmung der Elongation (WOLF et al., 1978). Es gibt allerdings Hinweise, daß doch eine schwache Komplexbildung stattfindet, dieser aber so verändert ist, daß die Bindung ans Ribosom nicht mehr erfolgen kann (FISCHER und WOLF, 1981).

Kirromycin dagegen verhindert durch seine Bindung an EF-Tu die Dissoziation von EF-Tu·GDP vom Ribosom nach erfolgter GTP-Hydrolyse (WOLF et al., 1974), da die EF-Tu·GTP-ähnliche Konformation aufrecht erhalten bleibt. Das Ribosom wird irreversibel blockiert, was zum Abbruch der Elongation führt.

Für die Wechselwirkung von Kirromycin mit EF-Tu scheint nur der Teil des Moleküls von Bedeutung zu sein, der dem 5'-Substituenten des zentralen Tetrahydrofurans entspricht, der Bereich also, mit dem Pulvomycin eine Ähnlichkeit zeigt (CHINALI, 1981). Dies schien die frühere Annahme einer gemeinsamen Bindungsstelle von Kirromycin und Pulvomycin an EF-Tu zu bestätigen (WOLF et al., 1978). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, daß die beiden Antibiotika wahrscheinlich an unterschiedlichen Stellen des Proteins binden, wobei die Möglichkeit eingeräumt wird, daß Pulvomycin Kirromycin an seiner Bindungsstelle ersetzen kann, aber nicht umgekehrt (PINGOUD et al., 1982 a).

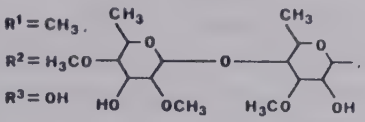


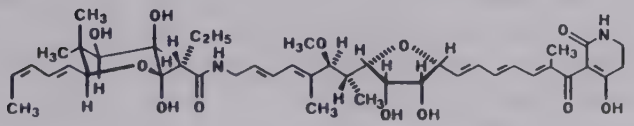
MOCIMYCIN, KIRROMYCIN: $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = OH$

AURODOX, X-5108, GOLDINOMYCIN: $R^1 = CH_3$, $R^2 = H$, $R^3 = OH$

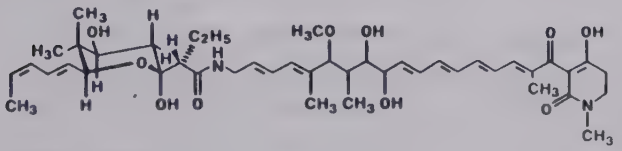
HENEICOMYCIN, A 21A: $R^1 = CH_3$, $R^2 = R^3 = H$

EFROTOMYCIN: $R^1 = CH_3$,

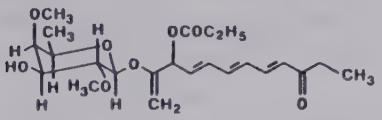




DIHYDROMOCIMYCIN



KIRROTHRICIN



LABILOMYCIN, PULVOMYCIN

Abb. 2: Antibiotika der Kirromycingruppe

Von E.coli wurden kirromycinresistente Mutanten selektioniert (FISCHER et al., 1977; VAN DE KLUNDERT et al., 1978), die einen veränderten EF-Tu haben. Im Falle der Mutante LBE 2045 (VAN DE KLUNDERT et al., 1978) lag die Veränderung nur bei einer Aminosäure, anstelle von Alanin in Position 375 ist ein Threoninrest eingebaut (DUISTERWINKEL et al., 1981). Auch bei der Mutante D 2216 (FISCHER et al., 1977) ist Ala-375 durch einen anderen Aminosäurerest, nämlich Valin, ersetzt, was zu drastischeren Änderungen der Eigenschaften gegenüber EF-Tu aus dem Wildtyp führt als der Ersatz durch Threonin (SWART et al., 1982). Allerdings ist nicht sicher, ob nicht noch andere Veränderungen erfolgt sind.

Auch bei Bacillus subtilis wurden Mutanten mit verändertem EF-Tu isoliert, der Resistenz gegen Kirromycin aufweist (SMITH und PARESS, 1978).

Bei den Untersuchungen von EF-Tu aus anderen Prokaryonten als E.coli fanden sich einige Organismen, die eine natürliche Resistenz ihrer Elongationsfaktoren gegen Kirromycin zeigten. KESSEL und KLINK (1981) werteten die bei EF-Tu aus Halobacterium cutirubrum gefundene Kirromycinresistenz als eventuelles Unterscheidungsmerkmal zwischen Eubakterien und Archaebakterien. Ähnliche Schlüsse zogen CAMMARANO et al. (1982) aus der Tatsache, daß der von ihnen untersuchte EF-Tu aus dem Archaebakterium Caldariella acidophila sowohl gegen Kirromycin, als auch Pulvomycin resistent ist. Nach BÖCK (1985) dehnt sich die Kirromycinresistenz auch auf andere Vertreter der Archaebakterien, die Methanobakterien, aus, wogegen die Pulvomycinresistenz von Caldariella acidophila bei den Archaebakterien als Ausnahme betrachtet werden muß.

Das Auffinden einer Wirkortresistenz gegen Kirromycin bei Sv.mobaraense zeigte, daß diese Eigenschaft nicht zur Abgrenzung der Archaebakterien von den Eubakterien herangezogen werden kann. Inzwischen hat sich auch herausgestellt, daß unter Lactobacillen eine solche Resistenz weit verbreitet ist (WÖRNER et al., 1983).

Bei einem Vertreter der Milchsäurebakterien, nämlich Lactobacillus acidophilus, wurde zum erstenmal bei Eubakterien eine Resistenz von EF-Tu gegen Pulvomycin ermittelt (WASILIU, 1983).

Mit Sv.mobaraense, dem Produzenten von Pulvomycin, war ein Stamm gefunden, der gegen ein Antibiotikum derselben Gruppe eine natürliche Wirkortresistenz aufweist, allerdings diese gegen sein eigenes Produkt nicht besitzt. Deshalb sollten weitere Produzenten von Antibiotika der Kirromycingruppe untersucht und beim Auftreten resistenter Elongationsfaktoren diese genauer charakterisiert werden. Es wurden dabei nicht nur Erkenntnisse im Hinblick auf Struktur und funktionelles Verhalten erwartet, sondern auch Hinweise, die den

Gesamtorganismus als Produzent eines Antibiotikums charakterisieren. Dazu sollten in die Voruntersuchungen zu Vergleichszwecken auch Actinomycetenstämme einbezogen werden, die kein Antibiotikum bilden.
Da von der Arbeit hauptsächlich das Auffinden von Resistenzen gegen Kirromycin und / oder Pulvomycin erwartet wurde, soll hier noch kurz auf die Möglichkeiten eingegangen werden, die ein Produzentenstamm hat, sich gegen sein eigenes Antibiotikum zu schützen. Übersichten hierzu geben DEMAIN (1974), VINING (1979) und CUNDLIFFE et al. (1984).
Die Schutzmechanismen eines Produzenten unterscheiden sich wahrscheinlich nicht von denen, die ein Zielorganismus entwickeln kann. In vielen Fällen sind Permeabilitätsveränderungen der Grund, daß ein Antibiotikum seinen Angriffspunkt nicht erreicht (Eindringungsresistenz); möglicherweise werden Antibiotika gegen einen Konzentrationsgradienten aus der Zelle transportiert. Eine andere Möglichkeit des Schutzes eröffnet sich durch die Bildung von Enzymen, die das Antibiotikum in eine inaktive oder weniger aktive Form überführen. Desweiteren kann die Biosynthese des Antibiotikums im Produzenten durch Feedback-Mechanismen so reguliert sein, daß die Bildung ab einer bestimmten kritischen Konzentration verhindert wird. Für das Kirromycinderivat Aurodox liegen Ergebnisse vor, die in diese Richtung weisen (LIU et al., 1977).
Eine Veränderung des Wirkorts dahingehend, daß keine Wechselwirkung mehr mit dem Antibiotikum stattfindet, stellt ebenfalls einen möglichen Schutzmechanismus dar (Wirkortresistenz). Dies kann so geschehen, daß der veränderte Wirkort konstitutiv vom Produzent gebildet wird, oder aber nur dann, wenn gleichzeitig das Antibiotikum produziert wird (MAURER et al., 1983).
Insgesamt sind die Erkenntnisse im Bezug auf das Verhalten des Produzenten bei der Vielzahl der bekannten Antibiotika eher spärlich. Es scheint, daß die Biosynthese dieser Sekundärmetabolite im allgemeinen ein gut regulierter Prozeß ist, wo die Aufgabe einer Feedback-Kontrolle nicht hauptsächlich im Schutz vor einer autotoxischen Wirkung liegen muß. Hierfür sind vermutlich die anderen aufgeführten Mechanismen von größerer Bedeutung, wobei diese auch im Zusammenspiel auftreten können.

II. MATERIAL UND METHODEN

II.1. Chemikalien, Enzyme und sonstiges Verbrauchsmaterial

Chemikalien für Nährmedien

Bacto-Agar, Bacto-Tryptone, Malzextrakt (Difco, Detroit, Mich., USA); Cerelose, Mannit (Maizenawerke, Hamburg); Hefeextrakt (Oxoid, Wesel); Sojamehl (Schoenenberger, Magstadt).

Chemikalien und Eichproteine für Gelelektrophorese

N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin TEMED (Bio-Rad, München); Carboanhydrase, Creatin-Kinase, Fumarase, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Phosphorylase b, Pyruvat-Kinase, Trypsin-Inhibitor (Boehringer, Mannheim); Acrylamid, Coomassie Brillant Blue G-250, Natriumdodecylsulfat SDS, N,N'-Methylenbisacrylamid (Serva, Heidelberg); α-Chymotrypsinogen A, ß-Lactoglobulin, Lysozym, Rinderserumalbumin (Sigma, München).

Radiochemikalien

[^{3}H]GDP, 14,4 Ci/mMol (533 GBq/mMol); [γ-^{32}P]GTP, 25 Ci/mMol (925 GBq/mMol); [^{14}C]Phenylalanin, 504 mCi/mMol (18,6 GBq/mMol) (Amersham Buchler, Braunschweig).

Chemikalien und Enzyme für in vitro Testsysteme

ADP, ATP, CTP, GDP, GDPCP, GTP, Lactat-Dehydrogenase LDH, NADH, Phosphoenolpyruvat, Polyuridylsäure, tRNA aus E.coli MRE 600, Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (Boehringer, Mannheim); Indubiose (Pointet-Girard, Villeneuve la Garenne, Frankreich); BAEE (Serva, Heidelberg); Freund'sches Adjuvans komplett und inkomplett, N-Ethylmaleimid (Sigma, München); TPCK-behandeltes Trypsin (Worthington, Freehold, N.J., USA); EF-Tu und EF-G aus E.coli MRE 600 (isoliert nach ARAI et al., 1972); Ribosomen aus E.coli MRE 600 (isoliert nach STAEHELIN und MAGLOTT, 1971); Phe-tRNA-Synthetase aus E.coli MRE 600 (isoliert nach STULBERG, 1967).

Gelmaterialien

AH-Sepharose 4B, DEAE-Sepharose CL-6B, Phenyl-Sepharose CL-4B, Sephadex G-25 fine, Sephadex G-100 (Pharmacia, Uppsala, Schweden).

Antibiotika

Efrotomycin (Merck-Sharp und Dohme, Rahway, N.J., USA); Kirromycin (isoliert nach WOLF und ZÄHNER, 1972); Kirrothricin (isoliert nach THEIN-SCHRANNER et al., 1982); Pulvomycin (isoliert nach ASSMANN und WOLF, 1979).

Sonstiges

Ultrafiltrationsmembranen (Amicon, Witten); PMSF (Boehringer, Mannheim); Papierrondellen, ø 6 mm (Macherey und Nagel, Düren); Nitrocellulosefilter SM 11306, ø 2,5 cm, Porengröße 0,45 µm (Sartorius, Göttingen); Aluminiumoxid Alcoa A-305 (Serva, Heidelberg); Whatman Glasfaserfilter GF/A, ø 2,5 cm, Whatman 3MM Papierfilter, ø 2,5 cm (Vetter, Wiesloch); DNase I (RNase-frei) (Worthington, Freehold, N.J., USA); Quickszint 402 (für wäßriges Material), Quickszint 501 (für nichtwäßriges Material), Szintillationsfläschchen (Zinsser, Frankfurt).

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität von Merck, Darmstadt, bezogen.

II.2. Nährmedien und Puffer

Nährmedien

Nr. 1 (HM)	10 g Malzextrakt, 4 g Hefeextrakt, 4 g Cerelose; ad 1 l entionisiertes Wasser (pH 7,5)
Nr. 2 (TY-GG)	10 g Bacto-Tryptone, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 5 g Glycerin, 2 g Glycin; ad 1 l entionisiertes Wasser (pH 7,5)
Nr. 3 (TN)	13 g Bacto-Tryptone, 7 g NaCl; ad 1 l entionisiertes Wasser (pH 7,0)
Nr. 4 (NL 19)	2 % Sojamehl, 2 % Mannit; in 1 l entionisiertem Wasser (pH 7,5)

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Medien 20 min bei 120°C im Autoklaven sterilisiert. Für feste Nährböden wurden 20 g Bacto-Agar pro Liter Nährlösung zugesetzt.

Puffer

Standardpuffer SP 10	60 mM Tris·HCl pH 7,6, 30 mM KCl, 30 mM NH_4Cl, 10,5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM EDTA, 5 mM 2-Mercaptoäthanol
Waschpuffer	10 mM Tris·HCl pH 7,6, 10 mM NH_4Cl, 10 mM $MgCl_2$

Sonstige Puffer sind beim jeweiligen Versuch beschrieben.

II.3. Versuchsorganismen

Stamm	produziertes Antibiotikum
Escherichia coli MRE 600*	
Streptomyces albus DSM 40652	
Streptomyces cinnamomeus Tü 89	Kirrothricin
Streptomyces collinus Tü 365	Kirromycin
Streptomyces diastatochromogenes ATCC 31013	Azdimycin
Streptomyces diastatochromogenes Tü W289*	Aurodox
Streptomyces diastatochromogenes Tü 1062	Kirromycin
Streptomyces fradiae Tü B108	
Streptomyces fradiae Tü 1222	Kirromycin
Streptomyces goldiniensis ATCC 21386	Aurodox
Streptomyces lactamdurans ATCC 27382	Efrotomycin
Streptoverticillium mobaraense Tü 1063*	Pulvomycin
Streptomyces olivaceus Tü B10	
Streptomyces ramocissimus ATCC 27529	Mocimycin, Dihydromocimycin
Streptomyces viridochromogenes Tü 57*	

Die Schüttelkulturen aller Actinomyceten wurden bei 30°C inkubiert, E.coli bei 34°C. Für die Anzucht im Fermenter ebenso wie für die Ausstriche auf festen Nährböden wurde eine Inkubationstemperatur von 27°C gewählt, mit Ausnahme der mit * bezeichneten Organismen, die auf Festmedien bei 37°C inkubiert wurden.
Wenn nicht anders vermerkt, erfolgte die Anzucht der Actinomyceten in Nährmedium Nr. 1, für E.coli wurde Nährmedium Nr. 3 verwendet.

Die Abkürzungen der Stammsammlungen bedeuten:

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen, F.R.G.
MRE	Microbiological Research Establishment, Porton, Nr Salisbury, Wiltshire, England
Tü	Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I, Universität, Tübingen, F.R.G.

II.4. Analytische Methoden

II.4.1. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von LOWRY et al. (1951) ermittelt. Als Standard diente Rinderserumalbumin.

II.4.2. Leitfähigkeitsmessung

Je 50 µl der zu messenden Probe wurden in 1 ml bidestilliertes Wasser pipettiert und die Leitfähigkeit bestimmt (Leitfähigkeitsmesser Typ CDM 2e, Radiometer, Kopenhagen).

II.4.3. Radioaktivitätsmessung

Die an Papier- bzw. Nitrocellulosefilter adsorbierte Radioaktivitätsmenge wurde mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillationszählers (Mark II, Nuclear Chicago, Des Plaines, USA oder Betaszint 2000, Berthold, Wildbad) in 3 ml Toluol-Szintillator Quickszint 501 bestimmt.
Wäßrige Proben (180 bis 200 µl) wurden in 3 ml Toluol-Szintillator Quickszint 402 ausgezählt.

II.4.4. Photometrische Bestimmung der Antibiotikakonzentration

Efrotomycin	$E^{1\%}_{327} = 216$ bei pH 7 (Phosphatpuffer) nach WAX et al. (1976)
Kirromycin	$E^{1\%}_{325} = 355$ in 0,1 N NaOH-Äthanol 1:1 nach WOLF et al. (1974)
Kirrothricin	29 300 $M^{-1}cm^{-1}$ (333 nm) in Methanol-NaOH nach THEIN-SCHRANNER et al. (1982)

Pulvomycin $E^{1\%}_{320} = 889$ in Methanol nach AKITA et al. (1963)

II.4.5. Magnesiumbestimmung

Der Magnesiumgehalt einer Probe wurde nach MANN und YOE (1956) mit Xylidyl-Blau ermittelt, wobei der Versuchsansatz auf 1/10 gegenüber der Vorschrift verkleinert wurde.

II.4.6. Enzymatische GDP-Bestimmung

Die GDP-Konzentration wurde in einem gekoppelten Test mit Hilfe der Enzyme Pyruvat-Kinase und Lactat-Dehydrogenase über die Extinktionsabnahme von NADH bei 340 nm gemessen (Boehringer Mannheim: Biochemica Information 1).

II.4.7. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Durchführung der Disk-Elektrophorese geschah nach LAEMMLI (1970).
Die Proben wurden mit Äthanol gefällt und nach dem Lösen in Probenpuffer 2 bis 5 min bei 95°C erhitzt. Bei der verwendeten Apparatur handelt es sich um das Screening System HAVANA von Desaga mit einer Doppeltrennzelle für zwei Gele der Größe 1,5 x 110 x 110. Die Proteine wurden bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA aufgetrennt. Das Färben und Fixieren der Gele erfolgte nach FAIRBANKS et al. (1971).
Eichproteine (Molekulargewicht): Phosphorylase b (97 400), Rinderserumalbumin (66 000), Pyruvat-Kinase (57 000), Fumarase (49 000), Creatin-Kinase (40 500), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (36 000), Carboanhydrase (29 000), α-Chymotrypsinogen A (25 000), Trypsin-Inhibitor (20 100), ß-Lactoglobulin (18 400), Lysozym (14 300).

II.5. In vivo Versuche

II.5.1. Verdünnungsreihentest

Durch diesen Test nach KAVANAGH (1963) wurden die minimalen Hemmkonzentrationen von Pulvomycin und Kirromycin für die in II.3. aufgeführten Bakterienstämme ermittelt.

II.5.2. Zeitlicher Verlauf von Proteinbiosynthese und Antibiotikaproduktion

150 µl NL 19 (2 % Sojamehl, 2 % Mannit) wurden mit einer Öse einer frischen Plattenkultur des entsprechenden Actinomyceten beimpft und bei 27°C geschüttelt. Die Probenentnahmen erfolgten durch steriles Dekantieren.

Proteinsynthese: Einbau von [^{14}C]Phenylalanin
10 µl [^{14}C]Phe (0,05 µCi = 1,85 kBq) wurden mit 0,5 ml Kultur 10 min bei 27°C geschüttelt. Nach Zugabe von 100 µl Phenylalaninlösung (10 mg/ml) wurde die Probe mit 1 ml 10 % Trichloressigsäure versetzt, 10 min auf 90°C erhitzt und über Glasfaserfilter (GF/A, ø 25 mm) filtriert. Danach wurde fünfmal mit je 2 ml 5 % TCA und einmal mit 2 ml Äthanol gewaschen, die Filter getrocknet und die verbliebene Radioaktivität ausgezählt (II.4.3.).

Antibiotikanachweis
10 µl Kulturfiltrat wurden auf Papierrondellen im Plattendiffusionstest gegen Bacillus brevis getestet. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert und die Hemmhöfe bestimmt. Aus den Fraktionen mit maximaler Aktivität wurde zur Identifizierung der antibiotischen Aktivität Kulturfiltrat mit Äthylacetat extrahiert und der erhaltene Extrakt an Kieselgel 60 F_{254} in Chloroform - Methanol-Ammoniak (8:3:1) chromatographiert. Die Identifizierung erfolgte autobiographisch und mit Hilfe von mitaufgetragenen Vergleichssubstanzen.

II.6. Isolierung und Reinigung der Elongationsfaktoren

II.6.1. Anzucht und Ernte der Bakterien

Schüttelkulturen
Die Zellen wurden in 500 ml Nährmedium 1 in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit einer Schikane auf einer rotierenden Schüttelmaschine (120 rpm) bei 30°C inkubiert. Die Ernte erfolgte in der späten logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Standardpuffer, der beim ersten Vorgang einen hohen Salzgehalt (1 M KCl) aufwies, gewaschen und bei -80°C aufbewahrt. Die Vorkulturen zur Beimpfung der Fermenter wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane in 100 ml Nährmedium angesetzt und bei 27°C und 120 rpm geschüttelt.

Fermentation im 10 l Maßstab
Im vergrößerten Maßstab wurden die Stämme S.cinnamomeus, S.lactamdurans und

Sv.mobaraense in einem Tischfermenter (Modell F-14, New Brunswick Scientific, New Brunswick, N.J., USA) vermehrt. Je 10 l Nährmedium wurden im Fermenter 20 min bei 120°C sterilisiert und mit einer entsprechenden Menge Vorkultur beimpft. Folgende Inkubationsbedingungen wurden gewählt:
Bei 27°C und 200 rpm (Blattrührer) wurden 2 l sterile Luft pro Minute eingeleitet. Einige Tropfen Antischaummittel (Polyol) wurden zugesetzt. Die Zellernte erfolgte mittels einer Durchlaufzentrifuge (Typ LW A205, Westfalia Separator, Oelde, Westf.). Die Zellen wurden portionsweise bei -80°C eingefroren.

Stamm	Nährmedium	Vorkultur		Fermentations-	Zellausbeute
		Alter	Menge	dauer	
S.cinnamomeus	1	43 h	300 ml	19 h	173 g
S.lactamdurans	1	30 h	400 ml	18 h	92 g
		32 h	400 ml	18 h	81 g
Sv.mobaraense	2	23 h	400 ml	19 h	101 g
		23 h	400 ml	20 h	159 g

II.6.2. Zellaufschluß

Die Durchführung erfolgte analog NIRENBERG und MATTHAEI (1961).
Die aufgetauten Zellen wurden mit zwei Zellgewichten portionsweise zugesetztem Aluminiumoxid Alcoa A-305 in einem vorgekühlten Porzellanmörser bei 4°C durch Zerreiben mit dem Pistill (ca. 20 min) aufgeschlossen. Die Elution erfolgte durch langsames Unterrühren von ein bis zwei Zellgewichten Standardpuffer, dem 1 µM GDP und als Proteasenhemmer 10 µM PMSF zugesetzt waren. Aluminiumoxid, Zelltrümmer und nicht aufgeschlossenes Material wurden durch Zentrifugation (10 min, 2°C, 20 000 x g) entfernt. Dem Überstand wurden 2 µg DNase/ml zugegeben und nochmals 30 min bei 30 000 x g zentrifugiert (S 30).

II.6.3. Partielle Reinigung des Elongationsfaktors Tu

Die S 30-Extrakte wurden auf Säulen (0,9 x 6,5 cm) mit DEAE-Sepharose aufgetragen, die mit Standardpuffer/1 µM GDP/10 µM PMSF äquilibriert waren. Mit drei Säulenvolumina des Äquilibrierungspuffers wurde nachgewaschen, die Elution erfolgte in einem Schritt mit Äquilibrierungspuffer, der 0,4 M KCl enthielt. Fraktionen zu 500 µl wurden gesammelt. Unter diesen Bedingungen wird

der Elongationsfaktor G zusammen mit EF-Tu eluiert. EF-Tu wurde über die Bindung von GDP (II.7.1.) nachgewiesen, entsprechende Fraktionen vereinigt und mit demselben Volumen Glycerin versetzt (Endkonzentration 44 %) bei -20°C aufbewahrt.

II.6.4. Reinigung von EF-Tu über GDP-Sepharose

Die Herstellung der GDP-Sepharose wurde wie bei VAN DER MEIDE et al. (1980) beschrieben durchgeführt.
Die Vorgehensweise bei der Reinigung von EF-Tu hält sich weitgehend an die Methode von JACOBSON und ROSENBUSCH (1977).
0,2 ml GDP-Sepharose (ca. 0,55 µMol GDP/ml Gel) in Standardpuffer mit 0,4 M NaCl zur Vermeidung von unspezifischen Adsorptionseffekten ans Gelmaterial wurden mit ca. 0,25 nMol partiell gereinigten EF-Tus 20 h unter leichtem Schütteln bei 4°C inkubiert, dann wie in der Literatur beschrieben weiterverfahren. Die Elution erfolgte mit Standardpuffer/0,4 M NaCl/100 µM GDP.

II.6.5. Reinigung von EF-Tu in größerem Maßstab

Die Reinigung über Ionenaustauschchromatographie und hydrophobe Chromatographie wurde routinemäßig bei 4°C für die Faktoren aus S.cinnamomeus, S.lactamdurans und Sv.mobaraense durchgeführt.

Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose (LEBERMAN et al., 1980)
Auf eine Säule (1,5 x 28 cm) mit DEAE-Sepharose wurde der S 30-Extrakt von 50 g Zellen des jeweiligen Stammes aufgetragen. Das Gel war mit SP 10/1 µM GDP/10 µM PMSF äquilibriert, nach dem Probenauftrag wurde mit ca. 50 ml dieses Puffers gewaschen. Die Elution der Elongationsfaktoren erfolgte durch einen linearen Gradienten von 0 bis 0,4 M KCl in 400 ml Äquilibrierungspuffer. Die Flußrate betrug 24 ml/h, es wurden Fraktionen von 4,8 ml gesammelt.

Hydrophobe Chromatographie an Phenyl-Sepharose
Die EF-Tu enthaltenden Fraktionen des DEAE-Sepharose-Laufs wurden vereinigt, 2 M an KCl gemacht und auf eine Säule (1,5 x 28 cm) von Phenyl-Sepharose, äquilibriert mit SP 10/1 µM GDP/10 µM PMSF/2 M KCl, aufgetragen. Nach Waschen mit ca. 55 ml des Äquilibrierungspuffers wurde die Säule mit einem linear abfallenden Gradienten von 1 M bis 0 KCl in 400 ml SP 10/1 µM GDP/10 µM PMSF entwickelt. Bei einer Flußrate von 24 ml/h wurden Fraktionen von 4,8 ml gesammelt. Die Fraktionen mit GDP-Bindungsaktivität wurden vereinigt, durch Ultrafiltration in einer Amicon-Zelle mit einer YM 10-Membran konzentriert

und in ca. 30 % Glycerin bei -20°C aufbewahrt.

II.6.6. Präparation von Ribosomen aus Actinomyceten

Es wurde nach der bei STAEHELIN und MAGLOTT (1971) beschriebenen Methode vorgegangen.
10 g Zellen von Sv.mobaraense wurden wie in II.6.2. aufgeschlossen, mit ca. 15 ml Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 500 mM NH_4Cl, 10 mM $MgCl_2$, 0,5 mM Dithioerythrit) eluiert und weiterverfahren wie in II.6.2. Der gewonnene S 30-Extrakt wurde 17 h bei 31 000 rpm (Beckman Ultrazentrifuge L5-50, Rotor SW 40) durch ein Saccharosekissen (1,1 M) zentrifugiert. Die sedimentierten Ribosomen wurden in 400 µl Puffer suspendiert, mit derselben Menge Glycerin versetzt und bei -20°C aufbewahrt.
Nach TISSIERES et al. (1959) wird der Konzentrationskoeffizient über die Absorption der Ribosomenlösung bei 260 nm gemessen. Es ergaben sich 425 A_{260}-Einheiten/ml, wobei die für E.coli-Ribosomen bestimmte Umrechnung zugrunde gelegt wurde (eine A_{260}-Einheit entspricht 25 pMol 70 S Ribosomen).

II.7. Testsysteme zum Nachweis und zur Charakterisierung von EF-Tu

II.7.1. GDP-Bindung

Die Bindung von [^{3}H]GDP an EF-Tu wurde nach MILLER und WEISSBACH (1974) über die Adsorption des entsprechenden EF-Tu·[^{3}H]GDP-Komplexes an Nitrocellulosefilter nachgewiesen. Nicht gebundenes [^{3}H]GDP wird ausgewaschen.
Durchführung: In 150 µl Standardpuffer wurden 100 pMol [^{3}H]GDP (0,1 µCi = 3,7 kBq) mit ausreichend EF-Tu 10 min bei 30°C inkubiert, 140 µl in 2 ml eiskalten Waschpuffer pipettiert, über Nitrocellulosefilter abgesaugt und die Filter nach viermaligem Waschen mit je 2 ml Waschpuffer unter der Rotlichtlampe (150 Watt) getrocknet. Die Radioaktivität wurde wie unter II.4.3. beschrieben gemessen.
Angaben, über die jeweils bei den anderen Versuchen eingesetzten Mengen an EF-Tu, wurden über die GDP-Bindung berechnet: 1 U EF-Tu entspricht der Menge Protein, die ein pMol GDP unter den gegebenen Bedingungen bindet bzw., da eine 1:1-Bindung vorliegt, 1 pMol EF-Tu (ARAI et al., 1972).

II.7.2. EF-Ts katalysierter Austausch von GDP

Zum Nachweis von EF-Ts wird dessen Eigenschaft benutzt, den GDP-Austausch an EF-Tu zu stimulieren. Ohne EF-Ts findet bei 0°C innerhalb von 5 min kein merklicher Austausch statt, wogegen im Beisein des Faktors die Werte der in 10 min bei 30°C durchgeführten GDP-Bindung erreicht werden (MILLER und WEISSBACH, 1974).
Durchführung: Eine konstante Menge EF-Tu·GDP (bis zu 50 pMol) und eine EF-Ts enthaltende Probe wurden nach Zugabe von 100 pMol [^{3}H]GDP (0,1 µCi = 3,7 kBq) in einem Gesamtvolumen von 150 µl Standardpuffer 5 min im Eisbad inkubiert. Ansonsten wurde weiterverfahren wie in II.7.1.

II.7.3. Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese

Die zellfreie Poly(U)-codierte Poly(Phe)-Synthese dient als Modellreaktion für die Elongationsphase der Proteinbiosynthese. Sowohl Initiation als auch Termination werden durch den Test nicht erfaßt. Die Initiation erfolgt unspezifisch durch eine hohe Magnesiumionenkonzentration. Der Nachweis geschieht über den Einbau von [^{14}C]Phenylalanin in Trichloressigsäure-unlösliches Polyphenylalanin (PARMEGGIANI et al., 1971).
Durchführung: In 90 µl Standardpuffer sind enthalten: 100 nMol GTP, 100 nMol ATP, 100 nMol Phosphoenolpyruvat, 60 µg tRNA aus E.coli MRE 600, 100 pMol [^{14}C]Phenylalanin (504 mCi/mMol = 18,6 GBq/mMol), 2 µg Phe-tRNA-Synthetase aus E.coli, 2 µg Pyruvat-Kinase, 48 pMol EF-G aus E.coli MRE 600, ca. 50 pMol EF-Tu aus verschiedenen Quellen.
Nach 10 min Vorinkubation bei 30°C wurde die Reaktion mit 2,5 pMol Ribosomen aus E.coli MRE 600 und 4 µg Poly(U) in 10 µl Standardpuffer gestartet, falls nicht anders vermerkt. Nach weiteren 10 min bei 30°C wurden 90 µl auf Papierfilter (Whatman 3MM) pipettiert, die Filter in einem Teflonfilterkorb (nach MATTHAEI, Schleicher und Schüll, Dassel) in kalte 10 %ige TCA getaucht. Zur Hydrolyse der gebildeten [^{14}C]Phe-tRNA wurde 15 min zum Kochen erhitzt, danach mit 5 %iger TCA (zweimal 10 min), Äther/Äthanol (1 + 1) 5 min und Äther 5 min gewaschen und anschließend die Filter unter der Rotlichtlampe getrocknet.
Zur Messung der verbliebenen Radioaktivität siehe II.4.3.
Wurde der Einfluß von Antibiotika auf die in vitro Proteinsynthese untersucht, wurden diese in 10 µl methanolischem Standardpuffer (Endkonzentration im Test 1 bis 2 % Methanol) zu Beginn der Vorinkubation zugesetzt.

II.7.4. Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht von EF-Tu und seiner Bruchstücke wurde mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese bestimmt (II.4.7.). Aus den mitgeführten Eichproteinen wurde eine Eichkurve erstellt, indem ihre relativen Beweglichkeiten (Laufstrecke des jeweiligen Proteins geteilt durch Gesamtlaufstrecke) gegen den Logarithmus des Molekulargewichts aufgetragen wurde (WEBER und OSBORN, 1969).

II.7.5. Stabilität von EF-Tu

II.7.5.1. Abhängigkeit von der Magnesiumionenkonzentration

Der Versuch wurde in einer Apparatur ähnlich der von COLOWICK und WOMACK (1969) für die kontinuierliche Gleichgewichtsdialyse beschriebenen durchgeführt. Die obere Dialysekammer enthielt in 500 µl Standardpuffer ca. 1,5 nMol EF-Tu, durch die untere Kammer wurde ein Strom Puffer I (50 mM Tris-HCL pH 8, 1 mM EDTA, 5 mM Mercaptoäthanol) mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,2 ml/h geleitet. Aus der oberen Kammer wurden zu bestimmten Zeiten Proben zu je 20 µl genommen und auf ihre GDP-Bindungsaktivität getestet (II.7.1.). Als Kontrolle wurde ein entsprechender Ansatz gemacht, wobei durch die untere Kammer Standardpuffer geleitet wurde.
Die Abnahme der Magnesiumionenkonzentration in der oberen Kammer wurde gesondert bestimmt, wobei die obere Kammer Standardpuffer enthielt, durch die untere Kammer wurde Puffer I geleitet. Die Magnesiumbestimmung erfolgte wie in II.4.5. beschrieben. Die Versuche wurden bei 4°C durchgeführt.

II.7.5.2. Thermische Stabilität von EF-Tu

Eine ausreichende Menge EF-Tu (ca. 20 bis 80 pMol) wurde in einem Volumen von 50 µl SP 10/1 µM GDP je 5 min bei Temperaturen zwischen 30 und 70°C inkubiert, auf Eis gestellt und die verbliebene Aktivität bestimmt (II.7.1. bzw. II.7.3.).

II.7.5.3. Einfluß von SH-Gruppenreagenzien auf die Aktivität von EF-Tu

Es wurde der Einfluß von N-Ethylmaleimid (NEM) auf EF-Tu untersucht. Die Versuche wurden nach MILLER et al. (1971) durchgeführt.
30 bis 60 pMol EF-Tu·GDP wurden mit 2 mM NEM in 100 µl mercaptoäthanolfreiem Standardpuffer bei 30°C inkubiert. Zu bestimmten Zeiten wurden Proben à 15 µl entnommen und zu 35 µl Standardpuffer (bei 4°C) pipettiert; das entspricht

etwa einem sechsfachen Überschuß an Mercaptoäthanol, der zur Entfernung von überschüssigem NEM nötig ist. Die so behandelten EF-Tu-Proben wurden auf die verbliebene Aktivität getestet (II.7.1. und II.7.3.). Mit den Kontrollansätzen, die kein NEM enthielten, wurde gleich verfahren.

II.7.5.4. Tryptische Proteolyse von EF-Tu

Ca. 0,3 mg EF-Tu·GDP wurden in Gegenwart von 1 µM GDP mit 1 % TPCK-behandeltem Trypsin (bezogen auf die Proteinmenge; ca. 35 U/mg, enzymatisch bestimmt mit BAEE) bei 25°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen, für die Elektrophorese in Probenpuffer pipettiert und sofort auf 95°C erhitzt. Die Proben, die anschließend in die Poly(Phe)-Synthese oder zur GDP-Bindung eingesetzt wurden, wurden mit Trypsin-Inhibitor (vierfache Menge bezogen auf Trypsin) gestoppt.

II.7.6. Bildung eines ternären Komplexes aus EF-Tu, GTP und Phe-tRNA

II.7.6.1. Darstellung der Phe-tRNA

Die Methode basiert auf der von VOORMA et al. (1971) beschriebenen.
Dabei werden tRNA aus E.coli MRE 600, sowie ein 100 000 x g Extrakt aus E.coli MRE 600 zum einen mit [^{14}C]Phenylalanin und zum anderen mit unmarkiertem Phenylalanin inkubiert. Die Isolierung der gebildeten Phe-tRNA erfolgte durch Phenolextraktion und zusätzlich durch Gelfiltration über Sephadex G-25.

II.7.6.2. Gelfiltration des ternären Komplexes

Mit Hilfe der Gelfiltration an Sephadex G-100 wurde der Einfluß der Antibiotika Kirromycin und Pulvomycin auf die Bildung des ternären Komplexes EF-Tu·GTP·Phe-tRNA untersucht (nach WOLF et al., 1978).
Durchführung: EF-Tu·GTP wurde durch Inkubation von ca. 1 nMol EF-Tu·GDP mit 850 nMol Phosphoenolpyruvat, 17 µg Pyruvat-Kinase und 85 nMol GTP in 45 µl Standardpuffer gebildet. Nach 10 min bei 30°C wurde auf 0°C abgekühlt, 5 µl methanolische Antibiotikalösung bzw. bei Kontrollen Puffer mit Methanol und 5 µl [^{14}C]Phe-tRNA (ca. 70 pMol) zugegeben und 10 min bei 0°C weiterinkubiert. 50 µl dieser Reaktionsmischung wurden bei 4°C über eine Sephadex G-100-Säule (0,6 x 39 cm) filtriert. Fraktionen von 200 µl/10 min wurden gesammelt, je 180 µl mit 3 ml Triton-Szintillator versetzt und die Radioaktivität bestimmt.

II.7.6.3. Hydrolyseschutz-Experimente nach PINGOUD et al. (1977)

Diese Methode stellt einen indirekten Beweis für die Bildung des ternären Komplexes dar. Freie Phe-tRNA hydrolysiert (Deacylierung) sehr rasch, während sie in der Form des ternären Komplexes vor Hydrolyse geschützt wird (BERES und LUCAS-LENARD, 1973). Somit gibt das Ausmaß der Hydrolyse von [^{14}C]Phe-tRNA Hinweis auf das Vorhandensein eines ternären Komplexes.
Durchführung:
a) Zeitabhängigkeit der Hydrolyse
In 300 µl Standardpuffer wurden 600 bis 900 pMol EF-Tu·GTP, 60 nMol GTP, 600 nMol Phosphoenolpyruvat, 12 µg Pyruvat-Kinase und 40 bis 60 pMol [^{14}C]Phe-tRNA bei 30°C ohne und mit einer bestimmten Menge der Antibiotika Kirromycin und Pulvomycin inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquots von 40 µl auf Papierfilter pipettiert und bis auf das Erhitzen wie in II.7.3. weiterverfahren. Im Kontrollansatz wurde die Hydrolyse in Abwesenheit von EF-Tu gemessen.
b) Abhängigkeit von der Pulvomycinkonzentration
100 bis 150 pMol EF-Tu·GTP wurden mit 10 nMol GTP, 100 nMol Phosphoenolpyruvat, 2 µg Pyruvat-Kinase und 10 pMol [^{14}C]Phe-tRNA, sowie den angegebenen Pulvomycinmengen in 50 µl Standardpuffer 1 h bei 30°C inkubiert, jeweils 40 µl auf Papierfilter gegeben und wie oben weiterbehandelt. Die Kontrollen enthielten keinen Elongationsfaktor.

II.7.7. Bindung von Phe-tRNA ans Ribosom

Die Bildung eines Komplexes aus Phe-tRNA, EF-Tu·GTP und Ribosom wurde durch Adsorption an Nitrocellulosefilter verfolgt (RAVEL et al., 1968).
Durchführung: 75 µl Standardpuffer mit 50 bis 100 pMol EF-Tu·GTP, 7 nMol GTP, 130 nMol Phosphoenolpyruvat, 4 µg Pyruvat-Kinase, 45 pMol Ribosomen aus E.coli oder 155 pMol Ribosomen aus Sv.mobaraense, 46 µg tRNA aus E.coli und 7 µg Poly(U) wurden in Gegenwart verschiedener Pulvomycinmengen 5 min bei 30°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 bis 40 pMol [^{14}C]Phe-tRNA in 25 µl Standardpuffer gestartet, nach 10 min bei 30°C wurde ein Aliquot des Ansatzes filtriert (II.7.1.). Zur Bestimmung der nicht enzymatischen, d.h. nicht EF-Tu-vermittelten Bindung von Phe-tRNA ans Ribosom wurde die Reaktion ohne EF-Tu-Zugabe durchgeführt.

II.7.8. Einfluß von Kirromycin und Pulvomycin auf den GDP-Austausch an EF-Tu

20 bis 40 pMol EF-Tu·GDP und 50 pMol GDP wurden mit verschiedenen Mengen Antibiotikum in 50 µl Standardpuffer 5 min bei 0°C vorinkubiert. Nach Zugabe von 100 pMol [^{3}H]GDP in 100 µl SP 10 wurde der Ansatz weitere 5 min bei 0°C belassen und anschließend das Ausmaß des GDP-Austausches durch Nitrocellulosefiltration bestimmt (II.7.1.).

II.7.9. EF-Tu-abhängige GTP-Hydrolyse

Der Versuch richtet sich nach der Vorschrift von PARMEGGIANI et al. (1971).
Durchführung: 20 bis 30 pMol EF-Tu·GDP wurden in Gegenwart verschiedener Mengen Kirromycin bzw. Pulvomycin mit 150 pMol [γ-^{32}P]GTP (25 Ci/mMol = 925 GBq/mMol) in 75 µl Standardpuffer bei 30°C inkubiert. Nach 20 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 75 µl Perchlorsäure (10 mM an KH_2PO_4) gestoppt. Zum Nachweis des freigesetzten [$^{32}P_i$] als Phosphododecamolybdat-Komplex wurden 300 µl 20 mM Natriummolybdat und zur Extraktion des Komplexes 400 µl Essigsäurepropylester zugegeben. Der Ansatz wurde gut durchmischt, zur Phasentrennung in einer Eppendorfzentrifuge kurz abzentrifugiert, 150 µl obere (organische) Phase auf 3MM-Filter pipettiert und nach dem Trocknen die Radioaktivität bestimmt (II.4.3.).

II.7.10. Bindung von Kirromycin und Pulvomycin an EF-Tu

Zur Untersuchung von Bindungsgleichgewichten zwischen Proteinen und kleinen Liganden wurde von HUMMEL und DREYER (1962) ein säulenchromatographisches Verfahren entwickelt.
Durchführung: Auf eine Säule (0,6 x 42 cm) mit Sephadex G-25 fine, die mit Kirromycin oder Pulvomycin in Standardpuffer äquilibriert war, wurden ca. 2 nMol EF-Tu·GDP in 200 µl Äquilibrierungspuffer aufgetragen und der Säulenlauf über die Messung der Extinktion bei 313 nm im Eluat verfolgt. Die Flußrate betrug 6 ml/h. Der Versuch wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

II.7.11. Wechselwirkung von EF-Tu mit Nukleotiden

II.7.11.1. Präparation von nukleotidfreiem EF-Tu (EF-Tu_f)

Die Präparation lehnt sich an die bei MILLER und WEISSBACH (1974) beschriebene Methode an.
GDP wurde durch Inkubation (20 min, 30°C) mit einem Überschuß an GDPCP aus

EF-Tu·GDP verdrängt und dieses schwächer gebundene Nukleotid anschließend durch Gelfiltration über Sephadex G-25 fine (Äquilibrierungspuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 5 mM Mercaptoäthanol) in Abwesenheit von Mg^{2+} wieder entfernt. Der Versuch wurde bei 4°C durchgeführt, den aktiven Fraktionen $MgCl_2$ und Glycerin (Endkonzentration 10 mM bzw. 15 %) zugesetzt und der so erhaltene $EF\text{-}Tu_f$ bei -20°C aufbewahrt. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der GDP-Verdrängung wurde der Elongationsfaktor zu Beginn der Präparation mit [^{3}H]GDP markiert.

II.7.11.2. Bestimmung der Dissoziationskonstanten von EF-Tu·GDP

Eine definierte Menge an nukleotidfreiem EF-Tu wurde mit unterschiedlichen Mengen [^{3}H]GDP inkubiert und die Menge des an EF-Tu gebundenen Liganden durch Nitrocellulosefiltration bestimmt (II.7.1.). Aus den ermittelten Meßwerten wurden die Dissoziationskonstanten nach der Methode von SCATCHARD (1949) berechnet.
Durchführung: $EF\text{-}Tu_f$ in einer Konzentration, die größenordnungsmäßig der erwarteten Dissoziationskonstanten entspricht, und [^{3}H]GDP in Konzentrationen zwischen 1 nM und 200 nM wurden 15 min bei 30°C in einem Volumen von 1,2 ml inkubiert. Zur Stabilisierung von $EF\text{-}Tu_f$ wurden 0,4 mg Rinderserumalbumin pro ml SP 10 zugesetzt. 1 ml wurde über Nitrocellulose filtriert und aus der auf dem Filter verbliebenen Radioaktivität die Konzentration des gebundenen Nukleotids bestimmt.

II.7.11.3. Herstellung von EF-Tu·[^{3}H]GDP

3 bis 5 nMol EF-Tu·GDP wurden mit [^{3}H]GDP (2 µCi = 74 kBq) in 200 µl Standardpuffer 15 min bei 30°C inkubiert und anschließend auf eine Säule (0,6 x 40 cm) mit Sephadex G-25 fine aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Standardpuffer bei Raumtemperatur. Bei einer Flußrate von 6 ml/h wurden Fraktionen à 5 min gesammelt. Die aktiven Fraktionen wurden durch Nitrocellulosefiltration ermittelt, mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 25 %) und bei -20°C aufbewahrt.

II.7.11.4. Verdrängung von EF-Tu-gebundenem [^{3}H]GDP durch unmarkierte Nukleotide

Wie bei ARAI et al. (1978) beschrieben, wurde eine konstante Menge EF-Tu·[^{3}H]GDP mit verschiedenen Mengen an nicht markierten Nukleotiden (GDP, GTP, ADP, ATP, CTP, UTP) in einem Gesamtvolumen von 500 µl Standardpuffer 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde ein Aliquot des Ansatzes durch Nitro-

cellulose filtriert und aus der auf dem Filter verbliebenen Radioaktivität der Anteil des nicht verdrängten [^{3}H]GDP bestimmt.

II.7.12. Immunologische Tests

II.7.12.1. Herstellung von Antiserum gegen EF-Tu

2 µl EF-Tu·GDP aus E.coli (39 mg/ml) wurden mit 0,5 ml Standardpuffer verdünnt, in 0,5 ml Freund'schem Adjuvans komplett emulgiert und je die Hälfte einer braunen Maus intraperitoneal injiziert. Nach zwei Wochen wurde die Immunisierung mit 4 µl EF-Tu·GDP in 0,5 ml Standardpuffer und 0,5 ml Freund'schem Adjuvans inkomplett wiederholt, nach weiteren zwei Wochen unter gleichen Bedingungen nochmals immunisiert. Ca. sechs Wochen nach der ersten Immunisierung wurden die Mäuse getötet, das Blut aufgefangen und bei 4°C stehengelassen. Nach einigen Stunden wurde das geronnene Blut mit dem Spatel von der Gefäßwand entfernt und über Nacht weiter bei 4°C stehengelassen. Die festen Blutbestandteile wurden abzentrifugiert, der Überstand (Serum) wurde in Portionen zu 50 µl bei -20°C eingefroren. Zur Gewinnung von Kontrollserum wurde der Vorgang mit dem Blut einer nicht immunisierten Maus durchgeführt.

II.7.12.2. Immunodiffusion nach OUCHTERLONY (1967)

Die Immunodiffusion erfolgte in Petrischalen mit 1 % Indubiose in 10 mM Tris-HCl pH 7,6/0,9 % NaCl.
In das zentrale Loch wurde Antiserum oder Kontrollserum (5 µl), in die peripheren Löcher verschiedene Verdünnungen der zu testenden EF-Tu-Lösungen (5 µl) gegeben. Das ausgefallene Protein wurde mit Coomassie Blue angefärbt. Die Durchführung richtete sich nach den Angaben von MAYER und WACKER (1978).

III. ERGEBNISSE

III.1. Untersuchungen an EF-Tu aus Actinomyceten im Vergleich zu EF-Tu aus E.coli

III.1.1. Empfindlichkeit gegen Antibiotika

Eine Übersicht der ermittelten Meßergebnisse gibt Tabelle 1.

III.1.1.1. Hemmung der Poly(Phe)-Synthese

Die Poly(Phe)-Synthese wurde wie in II.7.3. beschrieben durchgeführt, wobei partiell gereinigter EF-Tu·GDP aus Actinomyceten bzw. E.coli in Mengen von 40 bis 50 pMol eingesetzt wurde.

Einfluß von Kirromycin: Bei der Mehrzahl der vierzehn untersuchten Elongationsfaktoren aus Actinomyceten lagen die Werte für eine 50 % Hemmung der Poly(Phe)-Synthese zwischen 0,2 und 0,6 µM (bei E.coli 0,2 µM). Bei drei Stämmen, nämlich S.cinnamomeus, S.lactamdurans und Sv.mobaraense, war keine merkliche Hemmung der in vitro Proteinsynthese zu sehen, wobei die eingesetzte Kirromycinkonzentration von 0,5 mM an der oberen Grenze des Testsystems liegt. Diese drei Actinomyceten produzieren Antibiotika, die zur Kirromycingruppe gerechnet werden (Kirrothricin, Efrotomycin und Pulvomycin), wobei Kirrothricin und Efrotomycin Derivate des Kirromycins sind, Pulvomycin eine strukturelle Ähnlichkeit mit Kirromycin aufweist.

Einfluß von Kirrothricin und Efrotomycin: Alle drei gegen Kirromycin resistenten Elongationsfaktoren erwiesen sich auch gegen die beiden Kirromycinderivate als resistent. Für Kirrothricin konnte auch bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10^{-4} M keine Hemmung festgestellt werden. Für Efrotomycin lagen die Werte für eine 50 %ige Hemmung der Poly(Phe)-Synthese bei bzw. über 50 µM. Als Vergleich dazu wurde die Poly(Phe)-Synthese, katalysiert durch EF-Tu aus E.coli, schon durch Konzentrationen von 0,2 µM (Efrotomycin) bzw. 0,3 µM (Kirrothricin) zu 50 % gehemmt.
Es zeigt sich also, daß hier zwei Stämme gefunden wurden, die sich durch einen resistenten Wirkort vor der schädlichen Wirkung der von ihnen produzierten Substanz schützen können.

Einfluß von Pulvomycin: Gegen Pulvomycin erwiesen sich alle untersuchten Elongationsfaktoren der Actinomyceten als empfindlich. Die Werte für 50 %

Hemmung der Poly(Phe)-Synthese lagen zwischen 2 µM und 27 µM, also in vergleichbarer Größenordnung wie bei E.coli (5 µM). Auch der Produzent des Pulvomycins, Sv.mobaraense, zeigt mit 14 µM keine wesentlich erhöhte Resistenz. Die insgesamt höheren ID_{50}-Werte für Pulvomycin im Vergleich zu den für Kirromycin ermittelten sind vermutlich auf den unterschiedlichen Wirkungsmechanismus der beiden Antibiotika zurückzuführen.

III.1.1.2. Minimale Hemmkonzentration für Kirromycin und Pulvomycin

Die im Verdünnungsreihentest (II.5.1.) ermittelten Werte weichen teilweise stark von denen des in vitro Tests ab. Besonders für Kirromycin läßt sich nur ein empfindlicher Stamm finden (S.viridochromogenes). Die anderen sind wenig sensitiv (z.B. S.ramocissimus) oder resistent (einschließlich E.coli). Für Pulvomycin liegen die Werte überwiegend in vergleichbaren Größenordnungen zum in vitro Test. Fünf Stämme, darunter E.coli und der Pulvomycinproduzent Sv.mobaraense, erwiesen sich als pulvomycinresistent. Da durch die in vitro Tests eine Wirkortresistenz ausgeschlossen werden kann (Ausnahme: S.cinnamomeus, S.lactamdurans und Sv.mobaraense für Kirromycin), beruhen die im in vivo Test festgestellten Resistenzen vermutlich auf verminderter Eindringung des Antibiotikums. Einen bestätigenden Hinweis für eine Eindringungsresistenz liefert die Tatsache, daß die L-Form des ansonsten kirromycinresistenten Wildtyps von Proteus mirabilis durch die defekte bzw. nicht mehr vorhandene Zellwand hoch sensitiv gegenüber Kirromycin wird (WOLF und ZÄHNER, 1972).

III.1.2. Temperaturempfindlichkeit von EF-Tu

Die thermische Inaktivierbarkeit ist ein spezifisches Strukturmerkmal eines Proteins und sollte deshalb für die verschiedenen EF-Tu Spezies bestimmt werden. Die Aktivität hitzebehandelter EF-Tu·GDP-Komplexe wurde sowohl im Bezug auf die GDP-Bindung, als auch in der Poly(Phe)-Synthese gemessen. Alle getesteten, partiell gereinigten Faktoren aus Actinomyceten erwiesen sich im Falle der GDP-Bindungsaktivität im Vergleich zu E.coli als hitzelabiler, bei vier Stämmen war nach 5 min bei 50°C noch weniger als 20 % Restaktivität zu verzeichnen. Die Beständigkeit der Poly(Phe)-Syntheseaktivität gegen Hitze war insgesamt etwas höher als bei der GDP-Bindung und führte zu vergleichbaren Werten wie bei E.coli. Die höchste Empfindlichkeit zeigte hier, wie auch bei der GDP-Bindung, S.lactamdurans (Tabelle 2).

Tabelle 1

Empfindlichkeit gegen Antibiotika vom Kirromycintyp

Organismen	Kirromycin (µM)		Pulvomycin (µM)		Efrotomycin (µM)	Kirrothricin (µM)
	MIC	ID_{50}	MIC	ID_{50}	ID_{50}	ID_{50}
E.coli MRE 600 (RNase I⁻)	>100	0,2	>100	5	0,2	0,3
S.albus DSM 40652	130	0,6	>100	3		
S.cinnamomeus Tü 89	>100	>500	>120	25	50	>110
S.collinus Tü 365	70	0,7	<2	22		
S.diastatochromogenes ATCC 31013	>130	0,5	>100	29		
S.diastatochromogenes Tü 1062	100	0,3	<2	7		
S.diastatochromogenes Tü W289	130	0,2	24	10		
S.fradiae Tü B108	35	0,4	<2	10		
S.fradiae Tü 1222	130	0,6	12	10		
S.goldiniensis ATCC 21386	>130	0,3	14	12		
S.lactamdurans ATCC 27382	>100	>500	7	11	>50	>110
Sv.mobaraense Tü 1063	>100	>500	>120	15	>50	>110
S.olivaceus Tü B10	70	0,3	56	12		
S.ramocissimus ATCC 27529	35	0,3	<2	2		
S.viridochromogenes Tü 57	5	0,4	5	7		

MIC Minimale Hemmkonzentration im Verdünnungsreihentest

ID_{50} Die angegebenen Antibiotikakonzentrationen bewirken eine 50 %ige Hemmung der Poly(Phe)-Synthese. Die Werte wurden den Schaubildern Abb. 1 bis 3 im Anhang entnommen.

III.1.3. Molekulargewichtsbestimmung von EF-Tu

Zur Ermittlung des Molekulargewichts wurden die partiell gereinigten Elongationsfaktoren weiter über Affinitätschromatographie von anderen Proteinen abgetrennt (II.6.4.) und anschließend einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen (II.4.7.). Über GDP-Sepharose ergab sich, wie aus Abbildung 3 ersichtlich, eine zufriedenstellende Reinigung. Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte nach II.7.4. Über die Eichkurve wurden Werte von 46 500 bis 49 000 für EF-Tu aus Actinomyceten bestimmt (Tabelle 2). Das für EF-Tu aus E.coli erhaltene Molekulargewicht von 44 000 steht in guter Übereinstimmung mit dem von ARAI et al. (1980) über die Primärstruktur des Proteins ermittelten Wert von 43 225.

Tabelle 2

Thermische Stabilität und Molekulargewicht von EF-Tu

Organismen	Hitzestabilität (% Restaktivität)				Molekulargewicht
	GDP-Bindung		Poly(Phe)-Synthese		
	50°C	70°C	50°C	70°C	
E.coli MRE 600	91	<1	100	1	44 000
S.albus DSM 40652	17	1	-	-	48 000
S.cinnamomeus TÜ 89	68	2	100	3	47 000
S.collinus TÜ 365	66	<1	100	<1	49 000
S.diastatochromogenes ATCC 31013	45	<1	80	4	49 000
S.diastatochromogenes TÜ 1062	50	<1	67	2	49 000
S.diastatochromogenes TÜ W289	16	<1	100	4	47 500
S.fradiae TÜ B108	26	<1	100	11	47 500
S.fradiae TÜ 1222	35	1	77	<1	48 500
S.goldiniensis ATCC 21386	32	<1	100	5	47 500
S.lactamdurans ATCC 27382	4	<1	33	<1	48 000
Sv.mobaraense TÜ 1063	63	<1	70	<1	46 500
S.olivaceus TÜ B10	12	2	100	14	47 500
S.ramocissimus ATCC 27529	53	<1	44	2	48 000
S.viridochromogenes TÜ 57	35	<1	79	5	49 000

Hitzestabilität von EF-Tu·GDP: Durchführung siehe II.7.5.2.
Die Werte sind ausgedrückt in % der ursprünglichen Aktivität (bestimmt wie in II.7.1. bzw. II.7.3.).

Molekulargewicht von EF-Tu: Ermittlung über SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Abb. 3) nach II.7.4.

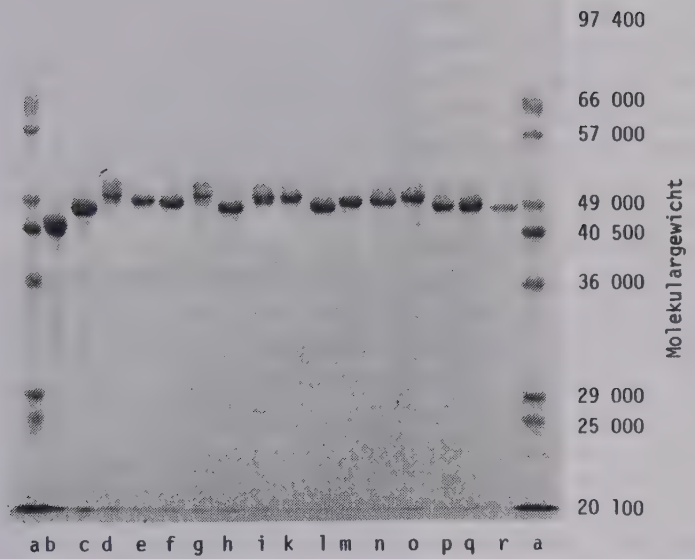


Abb. 3: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (10 % Acrylamid) der über Affinitätschromatographie (II.6.4.) gereinigten EF-Tus

(a) Eichproteine, (b) E.coli, (c) Sv.mobaraense, (d) S.diastatochromogenes Tü 1062, (e) S.lactamdurans, (f) S.goldiniensis, (g) S.viridochromogenes, (h) S.cinnamomeus, (i) S.collinus, (k) S.diastatochromogenes ATCC 31013, (l) S.fradiae Tü B108, (m) S.albus, (n) S.ramocissimus, (o) S.fradiae Tü 1222, (p) S.olivaceus, (q) S.diastatochromogenes Tü W289, (r) S.longispororuber

III.2. Morphologische Aspekte; zeitlicher Verlauf von Proteinsynthese und Antibiotikaproduktion

Aufgrund ihrer festgestellten besonderen Eigenschaften wurden drei der Actinomycetales-Stämme ausgewählt, deren EF-Tu im folgenden näher charakterisiert werden soll. Es sind dies S.cinnamomeus, der Produzent des Kirrothricins, der Wirkortresistenz gegen sein Produkt zeigt, S.lactamdurans, der ebenfalls gegen das von ihm gebildete Efrotomycin unempfindlich ist, sowie Sv.mobaraense, dessen Wirkort empfindlich ist gegen das von dem Stamm produzierte Pulvomycin, aber eine natürliche Resistenz gegen Kirromycin aufweist.
Morphologisch sind S.cinnamomeus und Sv.mobaraense durch typische vertizille Sporenträger (Abbildung 4 A und B), glatte Sporen und das Fehlen melanoider Pigmente artspezifisch charakterisiert (THEIN-SCHRANNER et al., 1982; ASSMANN und WOLF, 1979). Sie unterscheiden sich lediglich in der Luftmycelfarbe (cinnamomeus von griseus). Der Produzent des Efrotomycins konnte nicht nach morphologischen Merkmalen klassifiziert werden, da er keine Sporen bildet (STAPLEY et al., 1972). Er wurde als neue Art beschrieben aufgrund physiologischer Merkmale als S.lactamdurans (STAPLEY et al., 1972) und aufgrund biochemischer Merkmale der Zellwandbestandteile als Nocardia lactamdurans (WESSELING und LAGO, 1981).

Zur Untersuchung des Verhaltens der Organismen während der Produktionsphase des Antibiotikums wurde der zeitliche Verlauf von Proteinsynthese und Antibiotikabildung gemessen. Unter geeigneten Bedingungen erreichen Produzenten von Kirromycinen in Kultur Antibiotikakonzentrationen, die die empfindliche Proteinbiosynthese vollständig hemmen. Deshalb sollten sich im Verlauf der Fermentation bei Stämmen mit sensitivem EF-Tu getrennte Maxima zwischen Antibiotikakonzentration und Proteinsyntheseaktivität beobachten lassen, während dies bei Stämmen mit resistentem EF-Tu nicht notwendigerweise der Fall sein muß.
Im vorliegenden Experiment wurden sowohl die Antibiotikakonzentration, als auch die Proteinsyntheseaktivität von Proben während einer Fermentation bestimmt. Sv.mobaraense und S.collinus wurden als Stämme herangezogen, die einen gegen ihr eigenes toxisches Produkt empfindlichen EF-Tu besitzen, S.cinnamomeus und S.lactamdurans als Organismen mit resistentem EF-Tu. Der Einbau von markiertem Phenylalanin in Protein pro Volumeneinheit Kulturflüssigkeit war ein Maß für die Proteinsyntheseaktivität. Die Antibiotikakonzentration wurde mit Hilfe des Agardiffusionstests bestimmt. Da einige Stämme mehrere

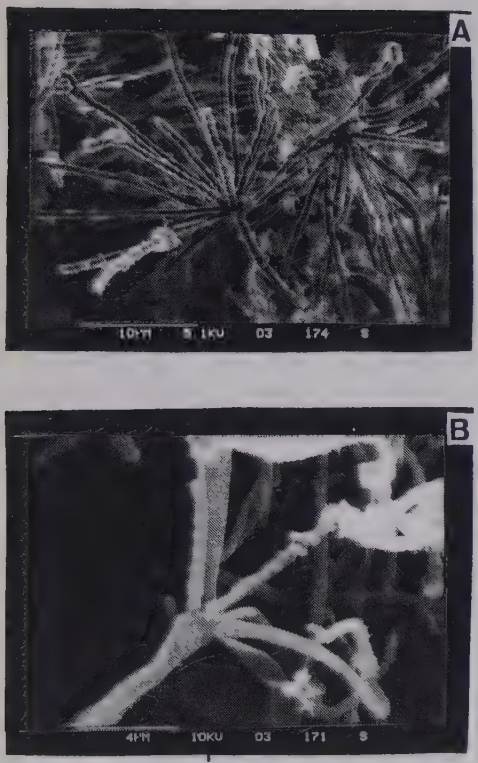


Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Sporenträger von (A) S.cinnamomeus (≙ Sv.cinnamomeum comb.nov.) und (B) Sv.mobaraense

Die Bilder wurden am Institut für Biologie III der Univ. Tübingen, Abt. Spezielle Zoologie von Herrn H. Schoppmann aufgenommen.

Kirromycine bilden, wurde auf eine genaue Quantifizierung verzichtet. Die bei Sv.mobaraense gemessene antibiotische Aktivität konnte nicht eindeutig als Pulvomycin identifiziert werden.

Die Abbildungen 5 A und D zeigen, daß bei Sv.mobaraense und S.collinus erwartungsgemäß Antibiotika- und Proteinsynthese deutlich getrennt sind. Bei Sv.mobaraense erfolgt erst die Produktion von Pulvomycin, dann Proteinsynthese. Diese ungewöhnliche Reihenfolge läßt weitere Proteinsynthese außerhalb des Meßbereichs (0 bis 30 h) vermuten.

Die Abbildungen 5 B und C zeigen den Fermentationsverlauf der Stämme mit resistentem EF-Tu. Hier sind die Phasen der Antibiotika- und Proteinsynthese

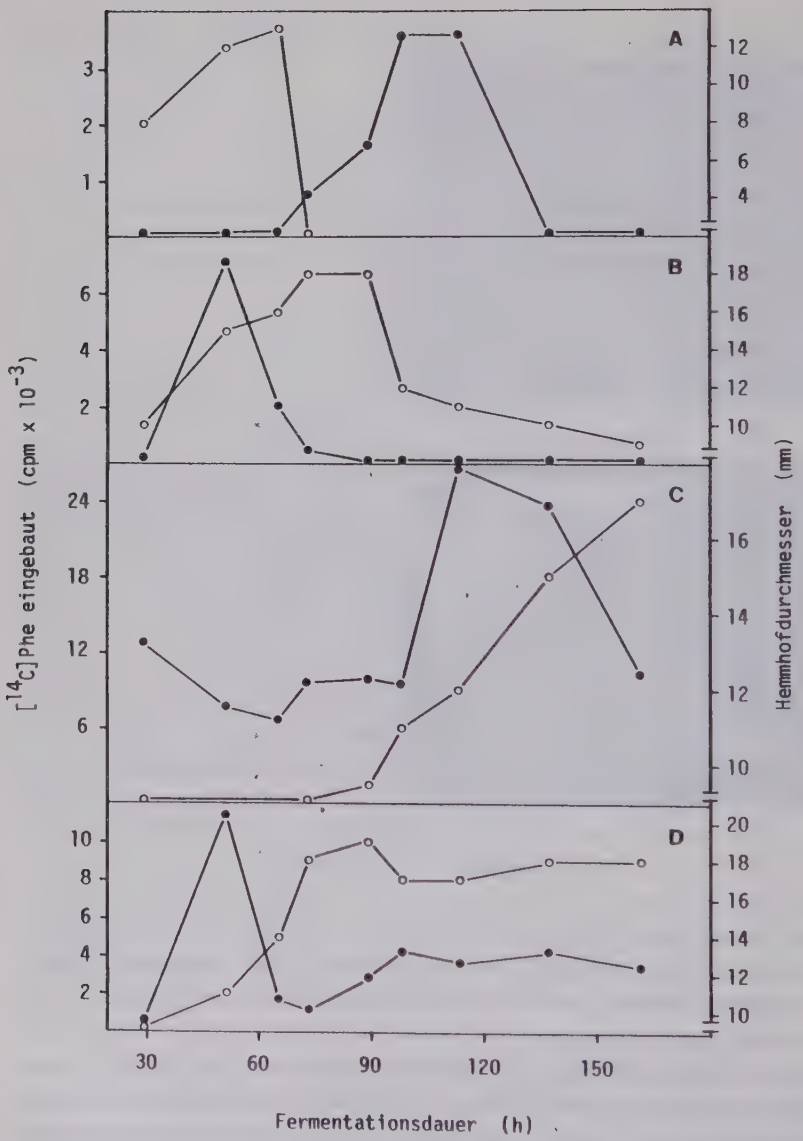


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf von Proteinbiosynthese und Antibiotikaproduktion

(A) Sv.mobaraense (Pulvomycin), (B) S.cinnamomeus (Kirrothricin), (C) S.lactamdurans (Efrotomycin), (D) S.collinus (Kirromycin)
Proteinsynthese (●), antibiotische Aktivität (○)

weniger deutlich getrennt. Es ist auch erkennbar, daß bei S.lactamdurans vor der ersten Probenahme nach 30 h schon ein Maximum der Proteinsynthese zu verzeichnen ist.

III.3. Reinigung von EF-Tu aus Sv.mobaraense, S.cinnamomeus und S.lactamdurans

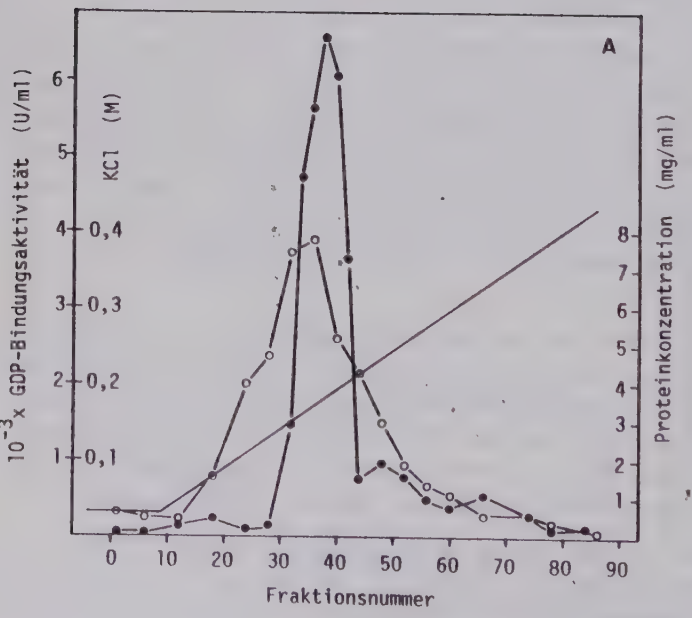
Zur Durchführung siehe II.6.5. Die Ergebnisse der Reinigungen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt, eine Analyse der einzelnen Reinigungsschritte durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese zeigt Abbildung 7. Stellvertretend für die Reinigung von EF-Tu sind die Elutionsdiagramme der Säulen für den Faktor aus Sv.mobaraense in Abbildung 6 zu sehen. Die Elutionsdiagramme für die Faktoren der anderen beiden Stämme sind als Abbildungen 4 und 5 im Anhang verzeichnet.

Sv.mobaraense: Von der DEAE-Sepharose wurde mit Hilfe des linearen Salzgradienten die EF-Tu-Aktivität (GDP-Bindung siehe II.7.1.) in einem Peak eluiert. Für die Spitzenfraktion wurde eine GDP-Bindung bei 0°C durchgeführt (II.7.2.) und dadurch die Anwesenheit von EF-Ts nachgewiesen. Somit handelt es sich bei dem Peak um EF-Tu·EF-Ts. Die Fraktionen 33 bis 43 wurden vereinigt und nach KCl-Zugabe (Endkonzentration 2 M) auf eine Säule von Phenyl-Sepharose aufgetragen. Die Elution mit absteigendem Salzgradienten ergab einen nach hinten etwas verbreiterten EF-Tu-Peak. Die Fraktionen 52 bis 66 (Peak III) wurden vereinigt, der Test auf EF-Ts verlief negativ. Als Peak IV wurden zusätzlich die Fraktionen 67 bis 89 gesammelt. Beide Sammelfraktionen wurden ultrafiltriert und zur Aufbewahrung mit dem gleichen Volumen Glycerin versetzt bei -20°C eingefroren.

S.cinnamomeus: Die von der DEAE-Sepharose eluierten EF-Tu-Fraktionen 33 bis 44 wurden als Peak I vereinigt und nach Zugabe von KCl (2 M) auf die Phenyl-Sepharose-Säule aufgetragen. Von dieser wurden die aktiven Fraktionen 66 bis 80 gesammelt, ultrafiltriert und nach Zugabe von Glycerin bei -20°C aufbewahrt. Sowohl Peak I als auch Peak II zeigten eine geringe Tendenz zur GDP-Bindung bei 0°C, was auf die Abwesenheit von EF-Ts schließen läßt.

S.lactamdurans: Bei der Elution von der DEAE-Sepharose-Säule ergaben sich zwei getrennte Maxima der EF-Tu-Aktivität. Mit Hilfe der GDP-Bindung bei 0°C wurde Peak I (Fraktion 28 bis 34) als EF-Tu·EF-Ts und Peak II (Fraktion 45 bis 54) als EF-Tu·GDP identifiziert. Zum Auftrag auf die Phenyl-Sepharose wurden beide Peaks vereinigt und bis zu einer Endkonzentration von 2 M mit KCl versetzt. Zur Unterstützung der Trennung von EF-Tu·EF-Ts wurde Peak I

zuvor noch mit GDP (Endkonzentration 20 µM) inkubiert. Die Elution von EF-Tu erfolgte in einem nach hinten verbreiterten Peak, so daß zu zwei Sammelfraktionen vereinigt wurde, nämlich Fraktion 90 bis 108 (Peak III) und Fraktion 109 bis 116 (Peak IV). Für Peak III konnte noch eine geringe EF-Ts-Aktivität ermittelt werden. Die Sammelfraktionen wurden nach der Ultrafiltration bei -20°C in Glycerin aufbewahrt.



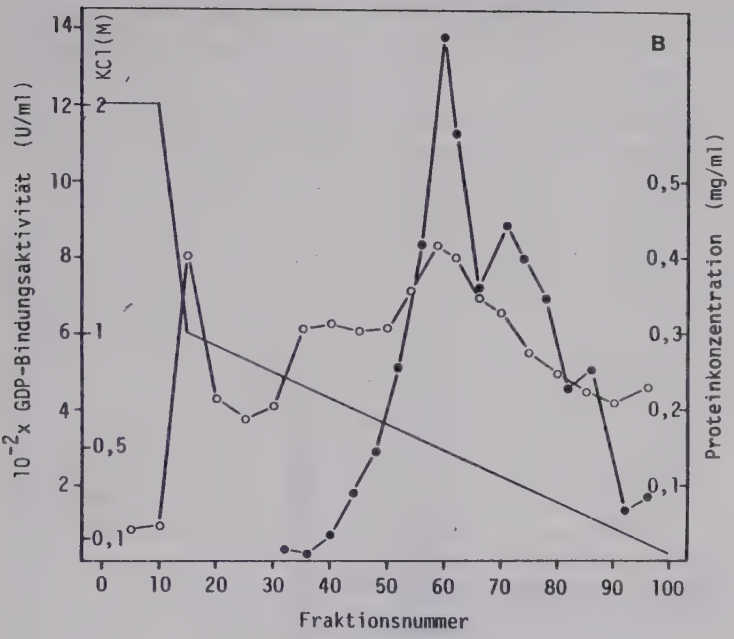


Abb. 6: Reinigung von EF-Tu aus Sv.mobaraense

(A) DEAE-Sepharose, (B) Phenyl-Sepharose
GDP-Bindungsaktivität: EF-Tu·GDP und EF-Tu·EF-Ts (●), Proteinkonzentration (○),
KCl-Gradient: bestimmt über Leitfähigkeitsmessung (——)

Die Verbindung der beiden Säulenarten ergibt für die zu untersuchenden Elongationsfaktoren zwar kein vollständig reines Protein, aber für die routinemäßige Reinigung ist es auch erforderlich, daß der Aufwand an Material, Zeit und Arbeit im vernünftigen Verhältnis zum Ergebnis steht. Da es sich bei EF-Tu um ein relativ empfindliches Protein handelt, spielt vor allem der Zeitfaktor bei der Reinigung eine Rolle. Der eingeschlagene Weg stellt einen befriedigenden Kompromiß dar.
Die Auswertung der Elektrophorese ergab Molekulargewichte von 46 000 (Sv.mo-

baraense), 47 000 (S.cinnamomeus) und 48 500 (S.lactamdurans), was gut mit den Werten in Tabelle 2 übereinstimmt.

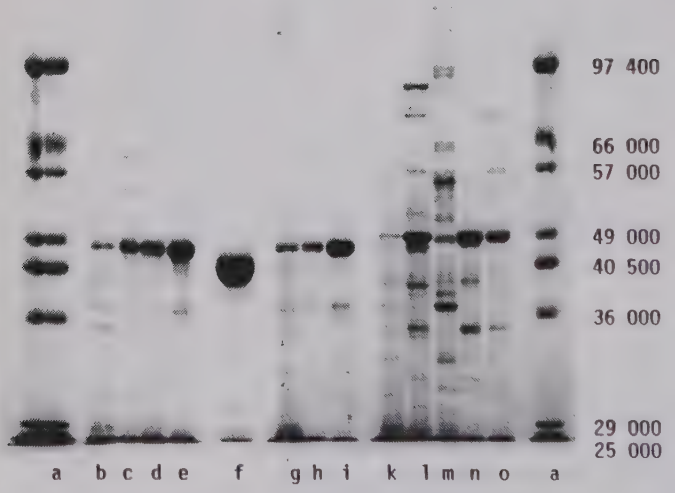


Abb. 7: Gelelektrophorese (10 % Acrylamid) zur Reinigung von EF-Tu·GDP aus Sv.mobaraense, S.cinnamomeus und S.lactamdurans

(a) Eichproteine, Sv.mobaraense: (b) S 30-Extrakt, (c) PI (DEAE-Sepharose), (d) PIII (Phenyl-Sepharose), (e) PIV (Phenyl-Sepharose), (f) EF-Tu·GDP aus E.coli, S.cinnamomeus: (g) S 30-Extrakt, (h) PI (DEAE-Sepharose), (i) PII (Phenyl-Sepharose), S.lactamdurans: (k) S 30-Extrakt, (l) PI (DEAE-Sepharose), (m) PII (DEAE-Sepharose), (n) PIII (Phenyl-Sepharose), (o) PIV (Phenyl-Sepharose)

Tabelle 3

Bilanzen der Reinigungen von EF-Tu·GDP aus Sv.mobaraense (A), S.cinnamomeus (B) und S.lactamdurans (C)

Reinigungsstufe	Volumen (ml)	Protein (mg)	spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)
(A) S 30	63	1 732	460	100
DEAE-Sepharose				
PI	49	294	1 070	40
Phenyl-Sepharose				
PIII	2,7	22	3 380	9
PIV	2,7	22	4 490	12
(B) S 30	79	616	465	100
DEAE-Sepharose				
PI	51	172	1 410	85
Phenyl-Sepharose				
PII	1,2	9,5	2 700	9
(C) S 30	73	942	110	100
DEAE-Sepharose				
PI	31	156	585	88
PII	42	66	1 035	66 *
Phenyl-Sepharose				
PIII	1,1	11	3 190	34
PIV	1,25	2,6	4 640	12

* Es ergibt sich im Bezug auf den S 30-Extrakt eine Ausbeute von 154 %, was nicht verwundern darf, da die Aktivitätsbestimmung im Rohextrakt sehr ungenau ist.

III.4. Charakterisierung von EF-Tu aus Sv.mobaraense, S.cinnamomeus und S.lactamdurans

III.4.1. Stabilität von EF-Tu

III.4.1.1. Abhängigkeit von der Magnesiumionenkonzentration

EF-Tu·GDP aus E.coli dissoziiert in Abwesenheit von Mg^{2+}, wobei sich GDP-freier EF-Tu als wesentlich instabiler erweist als im Beisein des Nukleotids (MILLER und WEISSBACH, 1970a).
Die Durchführung erfolgte wie in II.7.5.1. beschrieben. 1,4 nMol E.coli- bzw. 1,1 nMol Sv.mobaraense-EF-Tu·GDP wurden pro Dialysekammer eingesetzt. Bei EF-Tu aus E.coli ist die GDP-Bindungsaktivität auch nach 29 h Dialyse noch vollständig erhalten, obwohl schon seit einigen Stunden kein Magnesium mehr nachweisbar ist. EF-Tu aus Sv.mobaraense zeigt nach 24 h nur noch eine geringe Restaktivität im Bezug auf die GDP-Bindung (Abbildung 8).

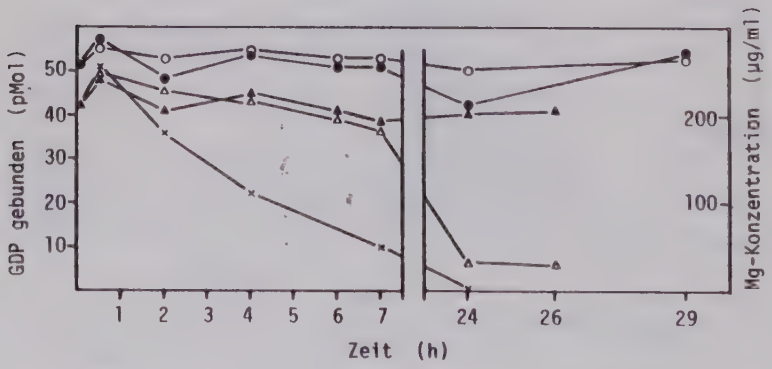


Abb. 8: Abhängigkeit der EF-Tu-Aktivität von der Magnesiumionenkonzentration

EF-Tu aus E.coli: + Mg^{2+} (●), - Mg^{2+} (○); EF-Tu aus Sv.mobaraense: + Mg^{2+} (▲), - Mg^{2+} (△); Magnesiumionenkonzentration (×)

III.4.1.2. Thermische Stabilität von EF-Tu

Die Hitzeempfindlichkeit von partiell gereinigtem EF-Tu·GDP wurde in III.1.2. schon grob untersucht. Mit den reinen EF-Tu-Präparationen wurden diese Versuche eingehender wiederholt. Die Ergebnisse konnten in der Tendenz bestätigt werden, nämlich daß die Elongationsfaktoren aus Actinomyceten im Bezug auf Hitzebehandlung empfindlicher sind als EF-Tu aus E.coli, daß S.lactamdurans den temperaturempfindlichsten EF-Tu besitzt und daß die Werte zur Inaktivierung der Poly(Phe)-Synthese-Aktivität etwas höher liegen als die für die GDP-Bindung. Die Temperaturen, bei denen nach 5 minütiger Inkubation noch 50 % Restaktivität vorhanden waren, wurden im einzelnen wie folgt ermittelt:

Pro Test eingesetzte EF-Tu·GDP-Menge	GDP-Bindung (Abbildung 9 A)	Poly(Phe)-Synthese (Abbildung 9 B)
48 pMol (E.coli)	51,5°C	54°C
48 pMol (Sv.mobaraense)	48°C	52°C
68 pMol (S.cinnamomeus)	47°C	52°C
52 pMol (S.lactamdurans)	42°C	49°C

Für Sv.mobaraense wurde zusätzlich noch die Hitzeempfindlichkeit von nukleotidfreiem EF-Tu überprüft. Pro Ansatz wurden jeweils 13 pMol in 50 µl Standardpuffer verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Dabei ergab sich 50 % Inaktivierung der GDP-Bindungsaktivität nach 5 min Inkubation bei 38°C (Abbildung 9 A). Die Fähigkeit zur Wechselwirkung mit EF-Ts erwies sich bei EF-Tu aus Sv.mobaraense als ähnlich hitzelabil wie die GDP-Bindungsaktivität (nicht gezeigt). Der Wert für 50 % Inaktivierung nach 5 min lag bei 46°C.

III.4.1.3. Einfluß von SH-Gruppen-Reagenzien

N-Ethylmaleimid hat bei EF-Tu aus E.coli keinen Einfluß auf die GDP-Bindungsaktivität, wenn die Einwirkung von NEM in Gegenwart von GDP stattfindet (MILLER et al., 1971).
Dasselbe Verhalten ergab sich für die untersuchten EF-Tu·GDP aus Actinomyceten. Auch nach 30 minütigem Einwirken von 2 mM NEM konnte kein signifikanter Aktivitätsverlust festgestellt werden. Wird die Inaktivierung der für die GDP-Bindung wichtigen SH-Gruppe durch die Anwesenheit von GDP verhindert, ergibt sich für die Poly(Phe)-Syntheseaktivität ein vollkommen anderes Bild.

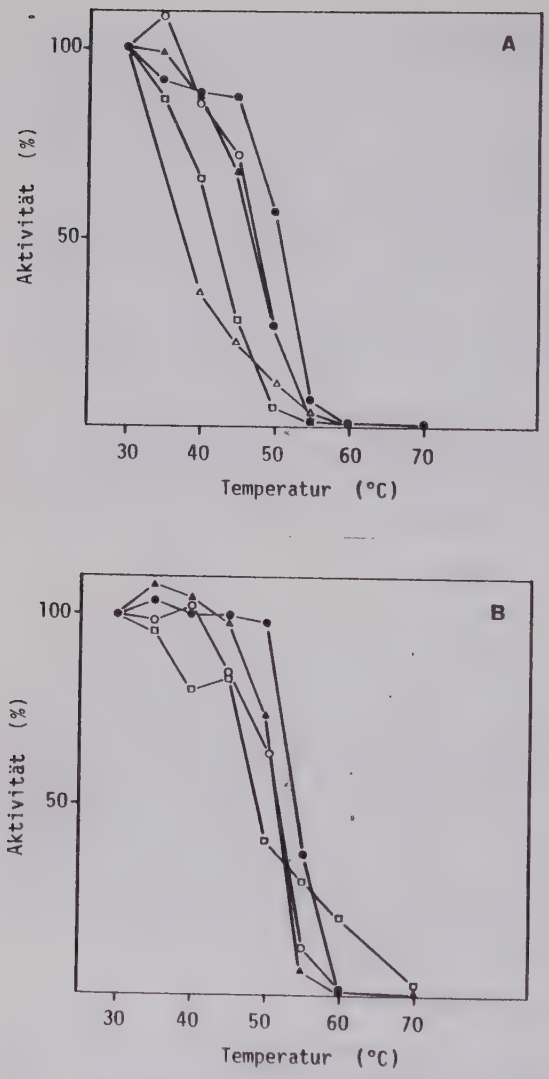


Abb. 9: Thermische Stabilität von EF-Tu

(A) GDP-Bindung, (B) Poly(Phe)-Synthese
EF-Tu·GDP aus E.coli (●), EF-Tu·GDP aus Sv.mobaraense (○), EF-Tu·GDP aus S.cinnamomeus (▲), EF-Tu·GDP aus S.lactamdurans (□), $EF\text{-}Tu_f$ aus Sv.mobaraense (△)

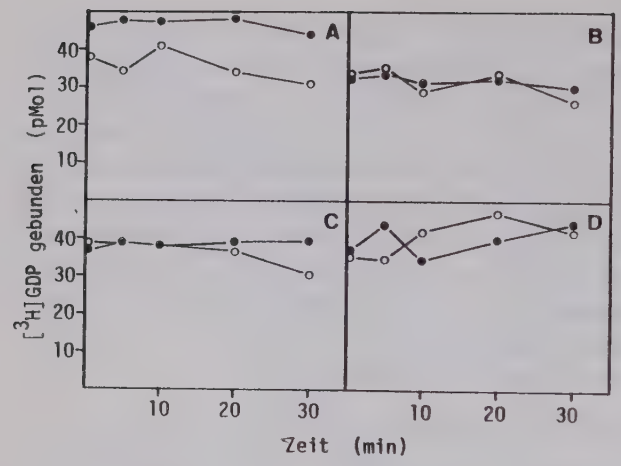
Sofort nach Zugabe von 2 mM NEM wird die Fähigkeit von EF-Tu zur Poly(Phe)-Synthese auf einen Bruchteil des Kontrollwertes herabgesetzt. Dies konnte wie bei E.coli auch für EF-Tu aus Sv.mobaraense und S.cinnamomeus gezeigt werden. Anders dagegen verhält sich EF-Tu aus S.lactamdurans. Auch nach 30 minütiger NEM-Behandlung ergab sich keine Verminderung der Poly(Phe)-Syntheseaktivität. Der Versuch wurde für diesen Faktor deshalb mit der doppelten Menge NEM im Ansatz wiederholt. Auch hier war keine Beeinflussung der Aktivität des EF-Tu erkennbar, was daraufhindeutet, daß bei diesem EF-Tu für die Durchführung der Poly(Phe)-Synthese keine SH-Gruppe essentiell oder aber diese für das inaktivierende Reagenz nicht zugänglich ist.
Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 zusammengefaßt.

III.4.1.4. Tryptische Proteolyse von EF-Tu

Die in II.7.5.4. beschriebene Proteolyse von EF-Tu·GDP mit Trypsin führte zu den im folgenden aufgelisteten Bruchstücken:

Organismus (MG von EF-Tu)	Fragment A	Fragment B	Fragment C
E.coli (43 500)	38 000	24 000	13 500
Sv.mobaraense (46 500)	42 500	25 500	13 500
S.cinnamomeus (47 000)	42 500	24 500	12 500
S.lactamdurans (48 000)	42 000	25 500	13 100

Der zeitliche Verlauf der Aufspaltung wird mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der Abbildung 11 verdeutlicht. Die oben angegebenen Molekulargewichte wurden hieraus durch Vergleich der relativen Beweglichkeiten mit denen der mitgeführten Eichproteine ermittelt.
Über die Proteolyse von EF-Tu·GDP aus E.coli mit Trypsin liegen zahlreiche Untersuchungen vor: GAST et al. (1976), ARAI et al. (1976), JACOBSON und ROSENBUSCH (1976a und 1977a), WITTINGHOFER et al. (1980).
Ein direkter Vergleich der jeweils erzielten Ergebnisse, vor allem was den



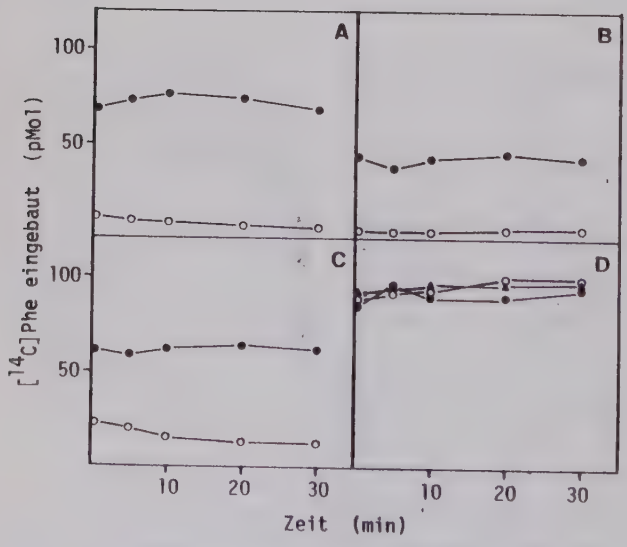


Abb. 10: NEM-Behandlung von EF-Tu·GDP

(A) EF-Tu·GDP aus E.coli, (B) EF-Tu·GDP aus Sv.mobaraense, (C) EF-Tu·GDP aus S.cinnamomeus, (D) EF-Tu·GDP aus S.lactamdurans
ohne NEM (●), mit 2 mM NEM (○), mit 4 mM NEM (▲)

zeitlichen Ablauf der Aufspaltung angeht, ist wegen der unterschiedlichen Versuchsbedingungen nicht gut möglich (siehe auch WITTINGHOFER et al., 1980). Dagegen kann man, was die Größe, Anzahl und die verbliebene Aktivität der Bruchstücke betrifft, durchaus vergleichen. Somit können die Ergebnisse der anderen Autoren für EF-Tu·GDP aus E.coli bestätigt werden. Auch das von GAST et al. (1976) und WITTINGHOFER et al. (1980) beschriebene Fragment A", das sich im Molekulargewicht um ca. 1 500 Dalton von nativem EF-Tu·GDP unterscheidet, ist auf dem Polyacrylamidgel sichtbar beim 2 min-Wert der Proteolyse. Das Molekulargewicht dieses Bruchstückes wurde mit 42 000 bestimmt. Somit ergibt sich für EF-Tu·GDP aus E.coli nach 2 min eine Aufspaltung in die Bruchstücke A" und A (das von anderen Autoren beschriebene Bruchstück D mit M_r= 5 000 bis 7 000 liegt außerhalb des Auftrennbereichs der Elektrophorese). Nach 5 min ist die Proteolyse des nativen EF-Tu·GDP abgeschlossen (auch Fragment A" ist verschwunden), und es beginnt die weitere Aufspaltung von Fragment A in die kleineren Bruchstücke B und C. Nach 4 h sind praktisch nur noch diese beiden Fragmente vorhanden, die gegen weiteren Trypsinabbau resistent sind. Inwieweit die Fähigkeit zur Poly(Phe)-Synthese durch die Trypsineinwirkung beeinträchtigt wird, ist aus Abbildung 12 ersichtlich. Es zeigt sich, daß durch die Spaltung in Fragment A praktisch kein Verlust dieser Aktivität eintritt, dies geschieht erst mit zunehmendem Abbau zu den kleineren Bruchstücken. Die Fähigkeit zur GDP-Bindung ist auch nach 4 h noch fast vollständig erhalten.

Bei den anderen drei untersuchten EF-Tu·GDP ruft Trypsin ein ganz ähnliches Spaltungsmuster hervor. Es entsteht jeweils ein Fragment A (nach 2 min), welches im Verlauf weiter abgebaut wird zu Bruchstück B und C, die, zumindest bei Sv.mobaraense und S.cinnamomeus auch nach 4 h nicht weiter durch Trypsin angegriffen werden. Ein Fragment A" konnte nicht festgestellt werden. Bei EF-Tu·GDP aus S.lactamdurans tritt Fragment A als Doppelbande auf (M_r= 43 000 und 42 000), auch scheinen hier die Fragmente B und C bei 40 bis 60 min ein Maximum an Menge zu erreichen und im weiteren Verlauf wieder abzunehmen. Dafür spräche auch die Tatsache, daß für diesen EF-Tu nach 4 h für die GDP-Bindungsaktivität nur noch ein Rest von 14 % zu ermitteln war, wogegen für Sv.mobaraense noch 62 %, für S.cinnamomeus 55 % Restaktivität vorhanden war (vergleiche E.coli: 96 %). Zur Kontrolle wurde EF-Tu·GDP unter gleichen Bedingungen nur ohne Trypsin 4 h bei 25°C inkubiert. Die verbliebene GDP-Bindungsaktivität lag bei allen vier EF-Tus über 80 %.

Der Verlust der Poly(Phe)-Syntheseaktivität ist für die drei Actinomyceten-EF-Tu nach 30 min fast vollständig, obwohl aus dem Elektrophoresemuster auf

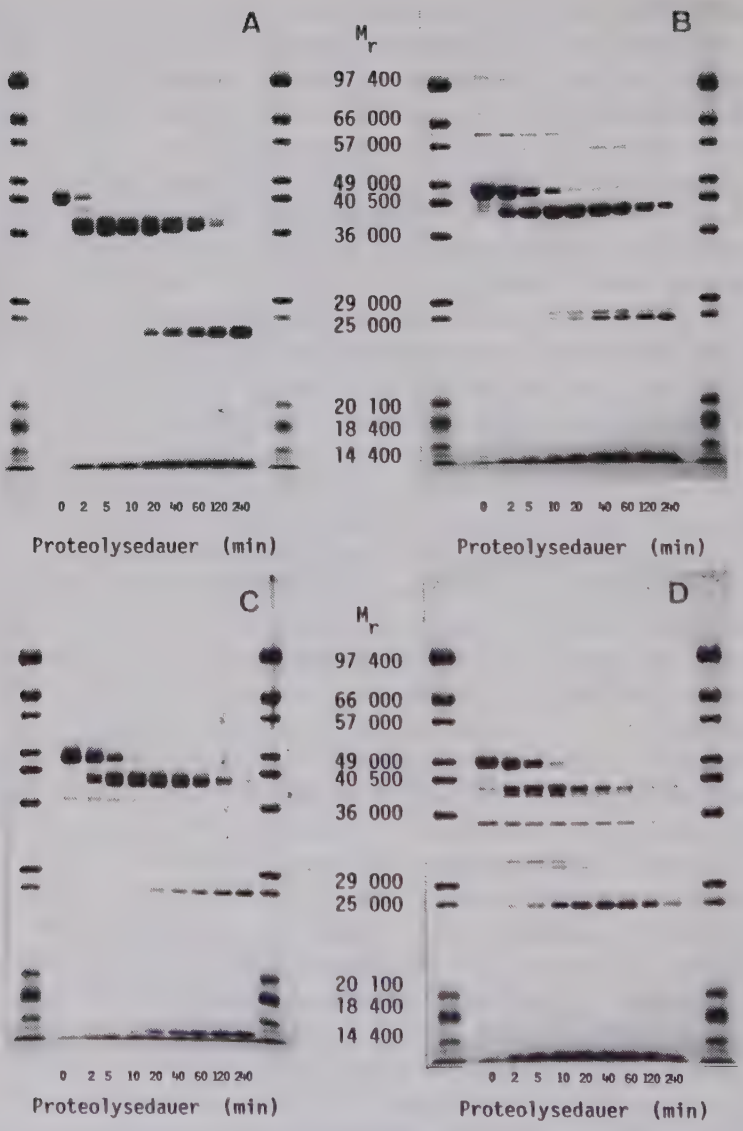


Abb. 11: Tryptische Proteolyse von EF-Tu·GDP: Gelelektrophoretische Analyse der Proteolyseprodukte (12 % Acrylamid)

(A) E.coli, (B) Sv.mobaraense, (C) S.cinnamomeus, (D) S.lactamdurans

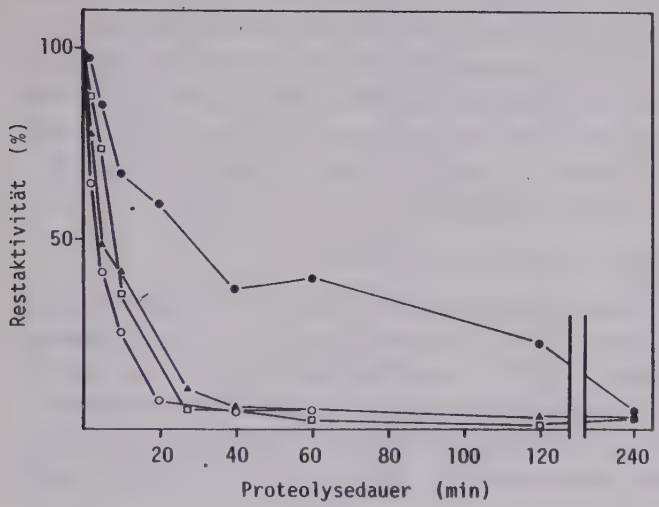


Abb. 12: Poly(Phe)-Syntheseaktivität von EF-Tu·GDP in Abhängigkeit von der Einwirkdauer von Trypsin

EF-Tu·GDP aus E.coli (●), EF-Tu·GDP aus Sv.mobaraense (○), EF-Tu·GDP aus S.cinnamomeus (▲), EF-Tu·GDP aus S.lactamdurans (□)

keinen schnelleren Abbau des Fragments A gegenüber dem von E.coli geschlossen werden kann.

III.4.2. Wechselwirkung von EF-Tu mit Nukleotiden

III.4.2.1. Bestimmung der Dissoziationskonstanten von EF-Tu·GDP

Die nach II.7.11.2. erhaltenen Meßwerte wurden nach SCATCHARD (1949) graphisch dargestellt und aus diesen Diagrammen die folgenden Dissoziationskonstanten für EF-Tu·GDP ermittelt:

E.coli	2 nM	(Abbildung 13 A)
Sv.mobaraense	19 nM	(Abbildung 13 B)
S.cinnamomeus	29 nM	(Abbildung 13 C)
S.lactamdurans	5 nM	(Abbildung 13 D)

Der für E.coli-EF-Tu·GDP erhaltene Wert von 2 nM steht in guter Übereinstimmung mit den von MILLER und WEISSBACH (1970) bzw. ARAI et al. (1974) beschriebenen Ergebnissen. Bei mehrmaligem Durchführen der Experimente ergab sich bei der Berechnung der Dissoziationskonstanten nie eine größere Abweichung als um den Faktor 2, der auch von MILLER und WEISSBACH (1970) als realistisch angegeben wird. Die Affinität für GDP ist bei allen drei untersuchten Actinomyceten-EF-Tu geringer als bei EF-Tu aus E.coli; bei EF-Tu aus S.lactamdurans nur geringfügig, bei den beiden anderen ca. um den Faktor 10.

III.4.2.2. Verdrängung von GDP durch andere Nukleotide

Die Affinität anderer Nukleotide zu den drei EF-Tus aus Actinomyceten wurde über ihre Fähigkeit, das an EF-Tu gebundene [^{3}H]GDP zu verdrängen, gemessen (zur Durchführung siehe II.7.11.4.). Aus Abbildung 14 A bis C wurde ermittelt, welcher Überschuß an GTP gegenüber GDP nötig ist, um 50 % des gebundenen [^{3}H]GDP zu verdrängen. Aus diesem Faktor wurden mit Hilfe der in III.4.2.1. ermittelten Dissoziationskonstanten für EF-Tu·GDP die entsprechenden Konstanten für EF-Tu·GTP abgeschätzt.

Organismus	Überschußfaktor	K_d für EF-Tu·GTP
Sv.mobaraense	40	760 nM
S.cinnamomeus	30	870 nM
S.lactamdurans	10	50 nM

Für EF-Tu aus E.coli ergab sich nach dieser Bestimmungsmethode ein Faktor von 20 (nicht gezeigt), was zu einer Dissoziationskonstante von 40 nM für EF-Tu·GTP führen würde. Dies liegt erheblich niedriger als in anderen Arbeiten (MILLER und WEISSBACH, 1970). Eine Bestimmung analog der Methode in II.7.11.2. erbrachte einen Wert von ca. 300 nM, was den Ergebnissen der anderen Arbeiten gleicht.
Für Sv.mobaraense wurde der Test noch mit weiteren Nukleotiden durchgeführt. Dabei zeigten ADP, ATP, UTP und CTP auch bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 9×10^{-5} M keinen Verdrängungseffekt (nicht gezeigt).

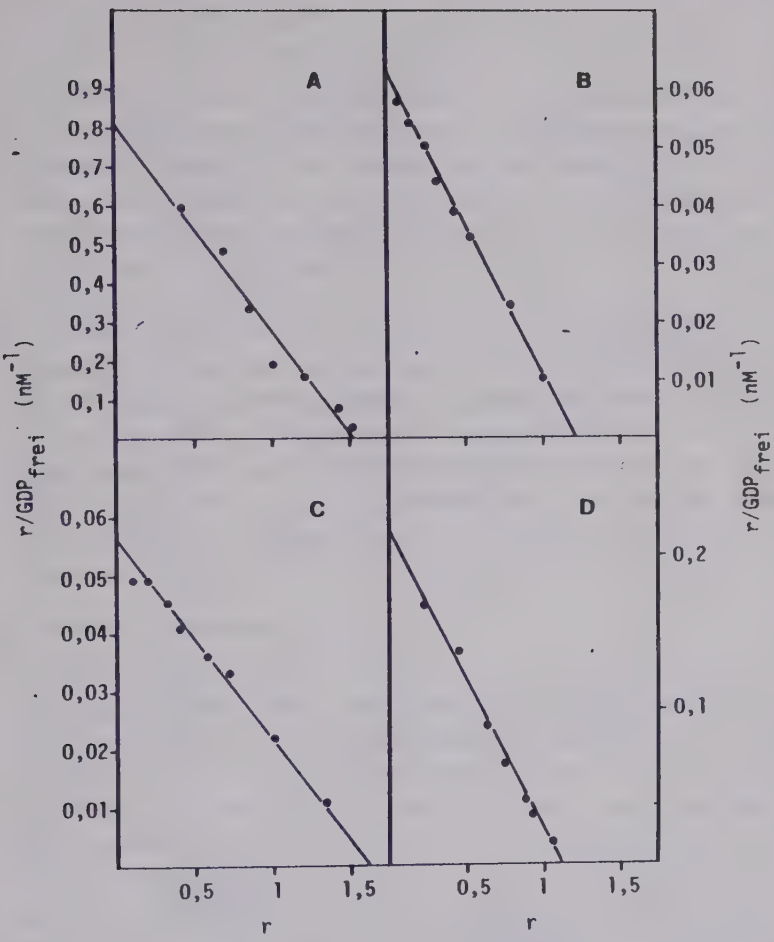


Abb. 13: Scatchard-Diagramme zur Bindung von GDP an EF-Tu

(A) EF-Tu aus E.coli, (B) EF-Tu aus Sv.mobaraense, (C) EF-Tu aus S.cinnamomeus, (D) EF-Tu aus S.lactamdurans
r entspricht der Konzentration des gebundenen GDP dividiert durch die eingesetzte Konzentration an EF-Tu

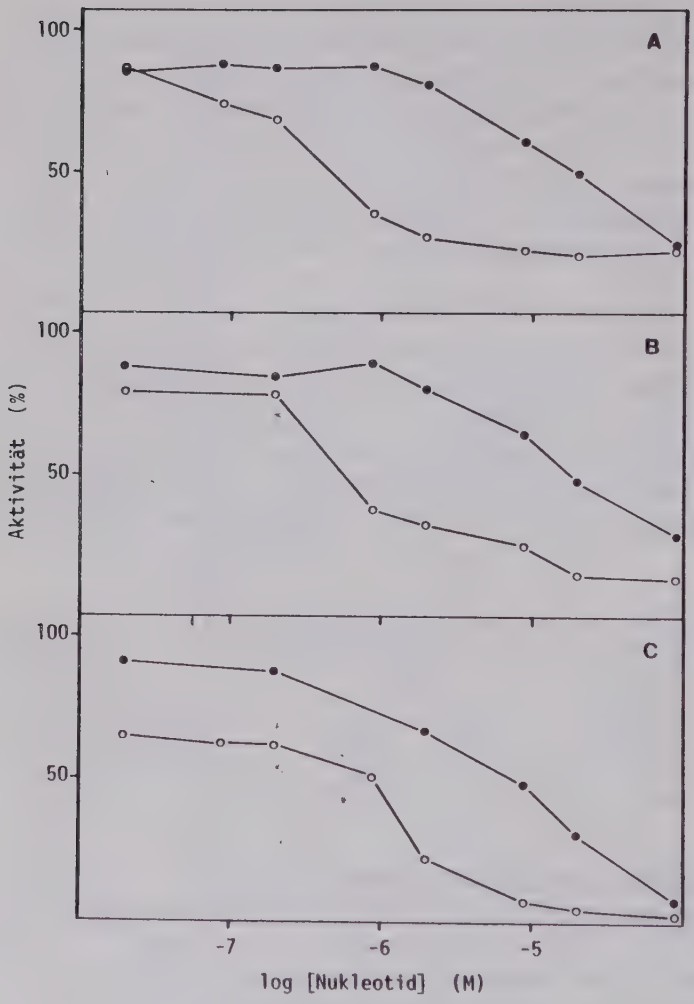


Abb. 14: Verdrängung von EF-Tu-gebundenem [^{3}H]GDP durch unmarkierte Nukleotide

(A) EF-Tu·[^{3}H]GDP aus Sv.mobaraense, (B) EF-Tu·[^{3}H]GDP aus S.cinnamomeus, (C) EF-Tu·[^{3}H]GDP aus S.lactamdurans
GDP (○), GTP (●)

III.4.3. Wechselwirkung der Antibiotika Kirromycin und Pulvomycin mit EF-Tu

III.4.3.1. Hemmung der Poly(Phe)-Synthese

Die in III.1.1.1. mit partiell gereinigten EF-Tu-Präparationen durchgeführten Versuche wurden mit reinem EF-Tu·GDP aus den drei untersuchten Actinomycetenstämmen wiederholt. Dabei ergaben sich dieselben Ergebnisse. Gegen Kirromycin waren alle drei EF-Tus nicht empfindlich im Bereich der eingesetzten Antibiotikakonzentrationen. Bei Pulvomycin waren zur 50 %igen Hemmung der Poly(Phe)-Synthese im Vergleich zu E.coli ca. 2 bis 5 fache Konzentrationen nötig.
Nun sollte noch untersucht werden, ob sich ein Unterschied der Antibiotikawirkung ergibt, wenn die Ribosomen von E.coli im Test durch Ribosomen aus dem entsprechenden Actinomyceten ersetzt werden. Der Ansatz wurde für Sv.mobaraense durchgeführt, die Versuchsbedingungen entsprachen den in II.7.3. beschriebenen. Statt 8 pMol Ribosomen aus E.coli wurden 22 pMol Ribosomen aus Sv.mobaraense eingesetzt. Wie aus Abbildung 15 ersichtlich, ergibt sich kein Unterschied im Effekt der beiden Antibiotika im Vergleich zum E.coli-System.

III.4.3.2. GDP-Austausch an EF-Tu

Bei 0°C erfolgt der Austausch von EF-Tu-gebundenem GDP gegen nicht gebundenes nur sehr langsam. Durch Zugabe von z. B. EF-Ts kann dieser Austausch erheblich beschleunigt werden. Ob die Antibiotika Kirromycin und Pulvomycin ebenfalls eine Wirkung auf den GDP-Austausch zeigen, wurde wie in II.7.8. beschrieben untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 zusammengefaßt. Wie man erkennt, zeigt Kirromycin bei EF-Tu aus E.coli eine deutliche Stimulierung des Austausches, hat dagegen bei den Actinomyceten-EF-Tus keinen Effekt. Pulvomycin bringt sowohl bei E.coli als auch bei den drei Actinomyceten eine sichtbare Beschleunigung des GDP-Austausches an EF-Tu. Die angegebenen Werte sind auf den GDP-Austausch bei 30°C (10 min) in Abwesenheit der Antibiotika bezogen (100 %).

III.4.3.3. GTP-Hydrolyse

Der ternäre Komplex wechselwirkt mit dem Ribosom unter Hydrolyse des an EF-Tu gebundenen GTP zu GDP und anorganischem Phosphat. Zur Durchführung dieser Reaktion ist die Anwesenheit der Hauptkomponenten der Proteinbiosynthese, nämlich Ribosomen, AA-tRNA und EF-Tu unerläßlich. Wie WOLF et al. (1974) für EF-Tu aus E.coli zeigen konnten, kann die Stimulierung der GTP-Hydrolyse

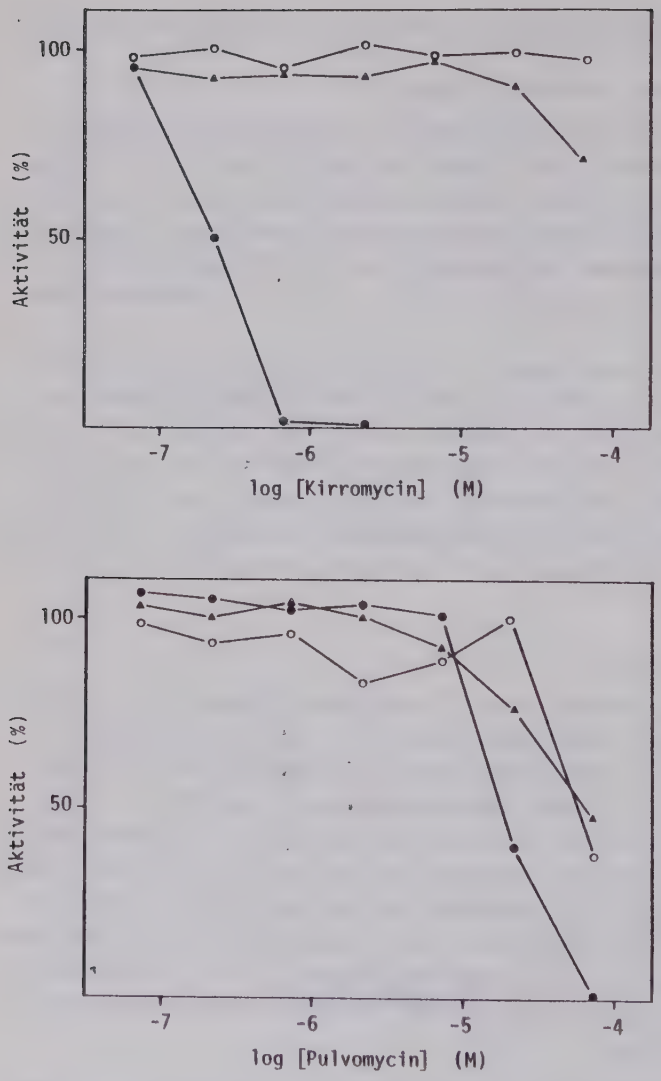


Abb. 15: Hemmung der Poly(Phe)-Synthese durch Kirromycin und Pulvomycin

EF-Tu·GDP und Ribosomen aus E.coli (●), EF-Tu·GDP aus Sv.mobaraense und Ribosomen aus E.coli (○), EF-Tu·GDP und Ribosomen aus Sv.mobaraense (▲)

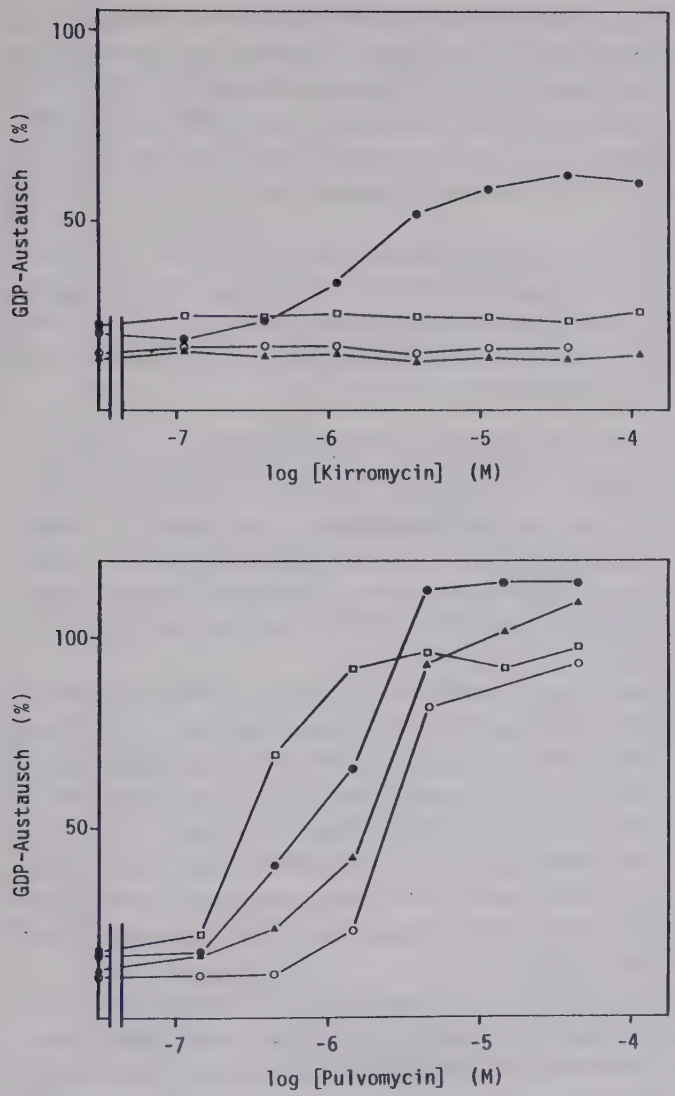


Abb. 16: GDP-Austausch an EF-Tu in Abhängigkeit von Kirromycin und Pulvomycin

EF-Tu aus E.coli (●), EF-Tu aus Sv.mobaraense (○), EF-Tu aus S.cinnamomeus (▲), EF-Tu aus S.lactamdurans (□)

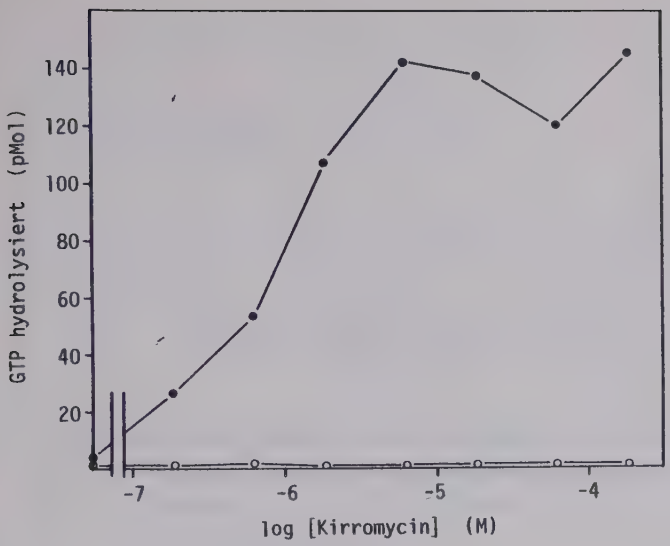
durch Zugabe von Kirromycin auch in Abwesenheit von Ribosomen und AA-tRNA erreicht werden, womit klar war, daß die GTPase-Aktivität eine Eigenschaft von EF-Tu und nicht der Ribosomen ist. Durch Pulvomycin dagegen wird die EF-Tu-abhängige GTPase-Reaktion im Beisein von Ribosomen und AA-tRNA gehemmt (WOLF et al., 1978). Im Gegensatz dazu tritt mit EF-Tu allein ebenfalls eine Stimulierung der Reaktion, allerdings in geringerem Ausmaß als durch Kirromycin, ein.
Aus Abbildung 17 ist der stimulierende Effekt von Kirromycin bei EF-Tu aus E.coli deutlich sichtbar, wogegen bei EF-Tu aus Sv.mobaraense keine Induktion der GTPase-Reaktion erreicht wird. Mit Pulvomycin ergibt sich für EF-Tu aus Sv.mobaraense eine geringfügige Stimulierung der Reaktion, deren Ausmaß aber um den Faktor 4 kleiner ist als bei EF-Tu aus E.coli.

III.4.3.4. Bindung von Kirromycin und Pulvomycin an EF-Tu

Bei den bisher beschriebenen Versuchen wurde gefunden, daß Kirromycin keine Wirkung auf die Aktivitäten der drei Actinomyceten-EF-Tus zeigt. Es war nun zu untersuchen, ob dieses Verhalten auf eine geringere Affinität des Antibiotikums als bei E.coli-EF-Tu zurückzuführen ist. Zum Nachweis einer Bindung wurde die Methode von HUMMEL und DREYER (1962) herangezogen und wie in II.7.10. beschrieben durchgeführt.
Protein (EF-Tu·GDP) und Ligand (Antibiotikum) wurden inkubiert und zur Abtrennung des eventuell entstandenen Protein-Liganden-Komplexes von freiem Protein und Ligand einer Gelfiltration unterworfen, wobei zur Erhaltung des Gleichgewichts auf der Säule eine konstante Konzentration an Ligand gewährleistet sein muß. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Größen wandern die Partner verschieden schnell durch die Säule. Bei Registrierung der Ligandenkonzentration im Eluat erscheint zuerst im Ausschlußvolumen der Protein-Liganden-Komplex als Peak und bei weiterer Elution als Tal die Konzentrationsfehlstelle des abgefangenen Liganden.
Wie aus Abbildung 18 ersichtlich ist, ergab sich für EF-Tu aus E.coli die erwartete Bindung von Kirromycin, wogegen für EF-Tu aus Sv.mobaraense keine Kirromycinbindung nachweisbar ist. Gleiches Verhalten zeigten die beiden übrigen Actinomyceten-EF-Tu (nicht abgebildet), was die bisherigen Ergebnisse bestätigt. Die Bindung von Pulvomycin an EF-Tu aus Sv.mobaraense wird sichtbar, allerdings schwächer als die an EF-Tu aus E.coli.

III.4.3.5. Bildung des ternären Komplexes

Die AA-tRNA wird mit Hilfe von EF-Tu in der Form des ternären Komplexes



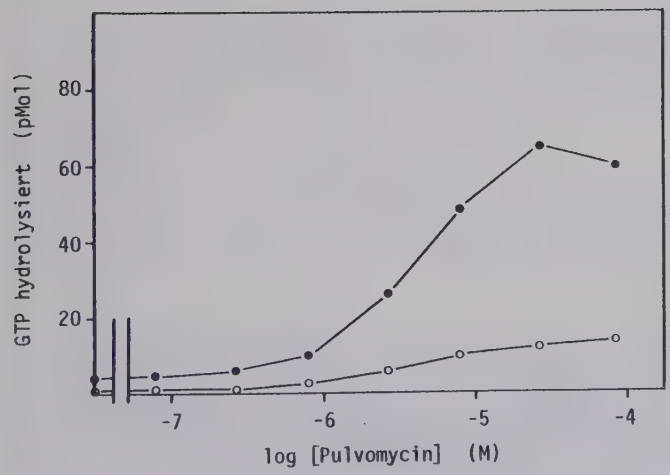


Abb. 17: Einfluß von Kirromycin und Pulvomycin auf die EF-Tu-abhängige GTPase-Reaktion

EF-Tu aus E.coli (●), EF-Tu aus Sv.mobaraense (○)

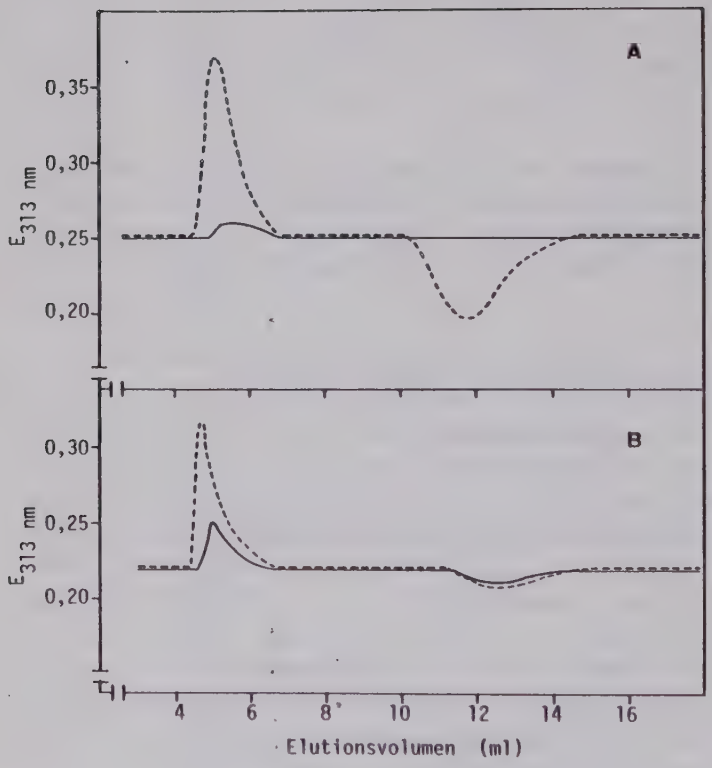


Abb. 18: Bindung von Kirromycin und Pulvomycin an EF-Tu·GDP

(A) Kirromycin (8,6 µM), (B) Pulvomycin (6,7 µM)
EF-Tu·GDP aus E.coli (---), EF-Tu·GDP aus Sv.mobaraense (——)

(EF-Tu·GTP·AA-tRNA) zum Ribosom transportiert. Zum Nachweis des ternären Komplexes stehen mehrere Methoden zur Verfügung:

a) Gelfiltration (SHOREY et al., 1969)
b) Nitrocellulosefiltration (GORDON, 1968)
c) Hydrolyseschutz (PINGOUD et al., 1977)

Die Nitrocellulosefiltration brachte, wie auch bei anderen Autoren (WITTINGHOFER et al., 1980), keine befriedigenden Ergebnisse, deshalb wurden die beiden anderen Methoden zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen EF-Tu·GTP, AA-tRNA und Pulvomycin herangezogen. Wie für E.coli gezeigt wurde (WOLF et al., 1978), verhindert Pulvomycin die Bindung von Phe-tRNA^{Phe} an EF-Tu·GTP.

Gelfiltration: Wie in den Abbildungen 19 A bis D zu sehen ist, führt die Anwesenheit von genügend hohen Pulvomycinkonzentrationen (Abbildung 19 D) dazu, daß unkomplexierte [^{14}C]Phe-tRNA eluiert wird wie in Abwesenheit von EF-Tu·GTP (Abbildung 19 B). Bei dem jeweils auftretenden Peak bei einem Elutionsvolumen von 11 ml handelt es sich um freies [^{14}C]Phe, das durch teilweise Deacylierung der [^{14}C]Phe-tRNA entsteht.
Die bei den Versuchen der Abbildung 20 eingesetzte Pulvomycinkonzentration bringt noch keinen so deutlichen Effekt, vor allem in Abbildung 20 D ist der Peak, der dem ternären Komplex entspricht, auch bei Anwesenheit von Pulvomycin noch vorhanden, nur die Verbreiterung nach hinten deutet die beginnende Aufspaltung bzw. nicht vollständige Bildung an.
Zusammenfassend läßt sich aber sagen, daß Pulvomycin einen ähnlichen Effekt wie bei E.coli auch bei der Bildung des ternären Komplexes mit EF-Tu aus den drei Actinomyceten zeigt, wobei die benötigten Pulvomycinkonzentrationen etwas höher liegen.

Hydrolyseschutz: Die Ergebnisse der nach II.7.6.3. durchgeführten Versuche bringen dieselben Aussagen wie oben. Wie bei E.coli entspricht die Kinetik der Deacylierung der [^{14}C]Phe-tRNA im ternären Komplex in Anwesenheit einer genügend hohen Pulvomycinkonzentration der der freien Phe-tRNA. Bei Abwesenheit von Pulvomycin besteht Hydrolyseschutz. Kirromycin setzt den Schutzeffekt wie bei E.coli geringfügig oder gar nicht herab (Abbildung 21 A bis C). Für EF-Tu aus Sv.mobaraense wurde der Versuch für verschiedene Pulvomycinkonzentrationen bei einer feststehenden Zeit wiederholt (II.7.6.3.). Abbildung 22 verdeutlicht die Abhängigkeit des EF-Tu-vermittelten Hydrolyseschutzes von der Pulvomycinkonzentration, wobei zu beachten ist, daß EF-Tu aus Sv.mobaraense in Abwesenheit von Pulvomycin schon einen geringeren Hydrolyseschutz

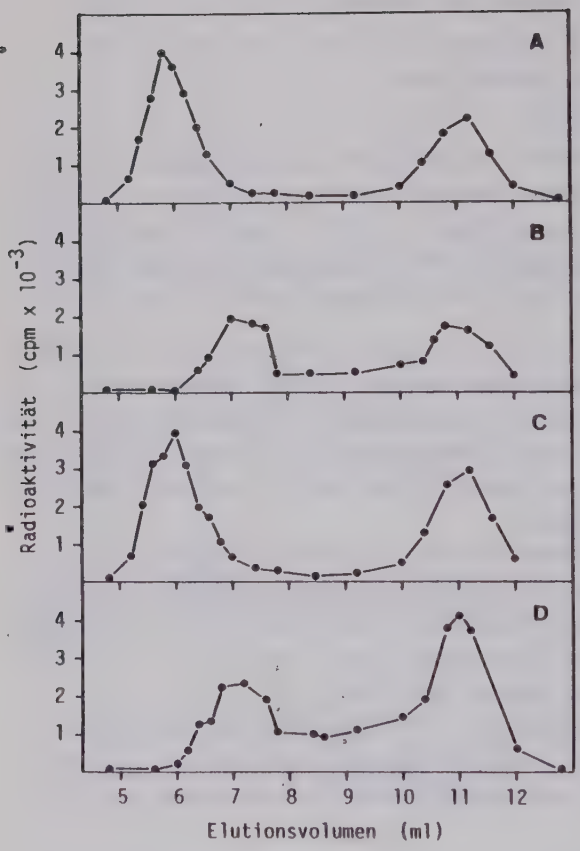


Abb. 19: Einfluß von Pulvomycin auf die Bildung des ternären Komplexes mit EF-Tu aus Sv.mobaraense untersucht mit Hilfe der Gelfiltration

(A) [^{14}C]Phe-tRNA + EF-Tu·GTP, (B) [^{14}C]Phe-tRNA, (C) [^{14}C]Phe-tRNA + EF-Tu·GTP in 3,95 x 10^{-5} M Pulvomycin im Auftrag, (D) [^{14}C]Phe-tRNA + EF-Tu·GTP in 7,6 x 10^{-5} M Pulvomycin im Auftrag

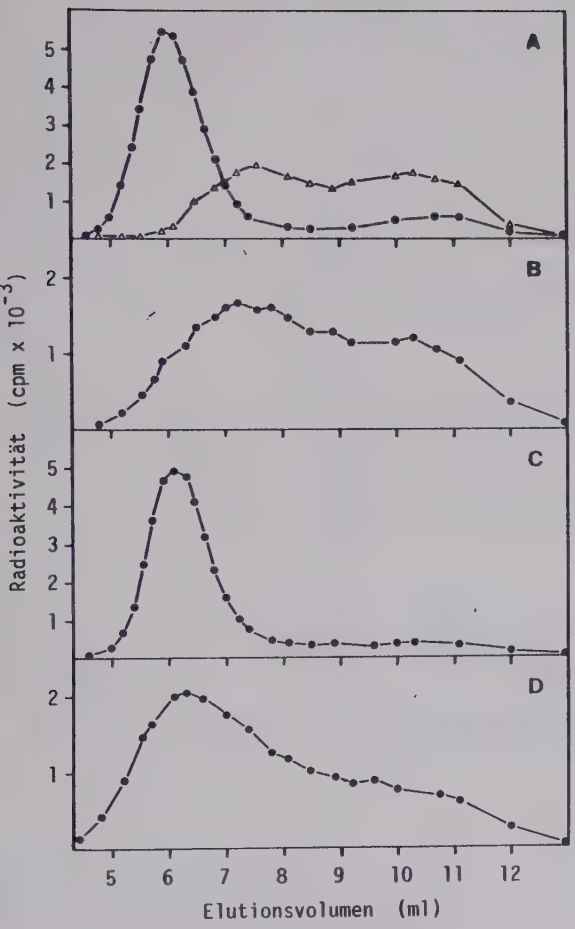


Abb. 20: Einfluß von Pulvomycin auf die Bildung des ternären Komplexes mit EF-Tu aus S.cinnamomeus (A, B) und S.lactamdurans (C, D)

(A) [^{14}C]Phe-tRNA + EF-Tu·GTP, [^{14}C]Phe-tRNA (△), (B) [^{14}C]Phe-tRNA + EF-Tu·GTP + 6,6 x 10^{-5} M Pulvomycin in 4,4 x 10^{-5} M Pulvomycin-Elutionspuffer, (C) [^{14}C]Phe-tRNA + EF-Tu·GTP, (D) [^{14}C]Phe-tRNA + EF-Tu·GTP + 6,6 x 10^{-5} M Pulvomycin in 4,4 x 10^{-5} M Pulvomycin-Elutionspuffer

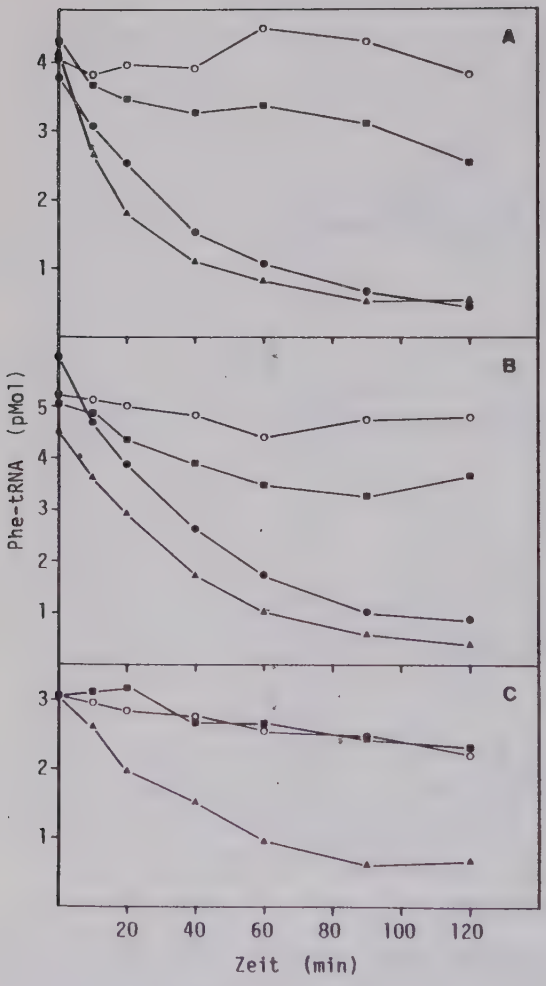


Abb. 21: Zeitabhängigkeit des EF-Tu-vermittelten Hydrolyseschutzes von Phe-tRNA

(A) Sv.mobaraense, (B) S.cinnamomeus, (C) S.lactamdurans
Kontrolle ohne EF-Tu (●), + EF-Tu·GTP (○), + EF-Tu·GTP + Pulvomycin 256 µM bei (A) und 290 µM bei (B) und (C) (▲), + EF-Tu·GTP + Kirromycin 305 µM (■)

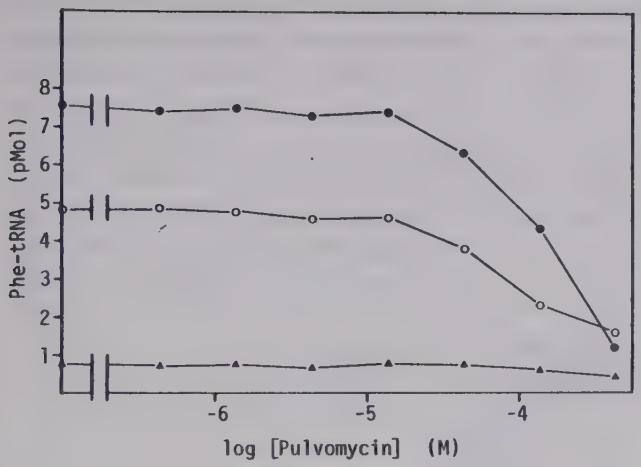


Abb. 22: Einfluß von Pulvomycin auf den EF-Tu-vermittelten Hydrolyseschutz von Phe-tRNA

+ EF-Tu·GTP aus E.coli (●), + EF-Tu·GTP aus Sv.mobaraense (○), Kontrolle ohne EF-Tu (▲)

bietet als EF-Tu aus E.coli.

III.4.3.6. Bindung von AA-tRNA ans Ribosom

Der Einfluß von Pulvomycin auf die enzymatische, EF-Tu-vermittelte Bindung von Phe-tRNA ans Ribosom wurde wie in II.7.7. beschrieben untersucht. Auch in Abwesenheit von EF-Tu tritt eine Bindung ans Ribosom auf (nicht enzymatisch), die aber durch Zugabe von nicht beladener tRNA verringert werden kann.
Wie Abbildung 23 zeigt, wird die durch EF-Tu aus E.coli vermittelte Bindung bei höheren Pulvomycinkonzentrationen vollständig unterdrückt, wogegen kein Einfluß auf die nicht enzymatische Bindung und die durch EF-Tu aus Sv.mobaraense vermittelte Bindung zu erkennen ist. Bei den beiden anderen EF-Tu tritt allenfalls eine geringfügige Hemmung bei der höchsten eingesetzten Pulvomycin-

konzentration ein. Die Ansätze für die Actinomyceten-EF-Tus wurden mit Ribosomen aus Sv.mobaraense durchgeführt. Wurden diese durch E.coli-Ribosomen ersetzt, war das Ausmaß der Bindung insgesamt stark verringert, eine Beeinflussung durch Pulvomycin konnte hier nicht festgestellt werden (nicht gezeigt).

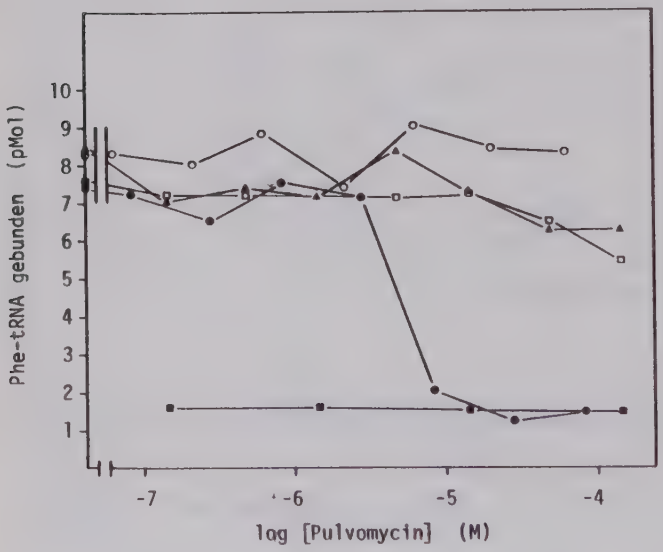


Abb. 23: Enzymatische und nicht enzymatische Bindung von Phe-tRNA ans Ribosom

EF-Tu aus E.coli (●), EF-Tu aus Sv.mobaraense (○), EF-Tu aus S.cinnamomeus (▲), EF-Tu aus S.lactamdurans (□), Kontrolle ohne EF-Tu (■)

III.4.4. Immunodiffusionstest

Zur Feststellung gewisser struktureller Verwandtschaften zwischen den Elongationsfaktoren aus unterschiedlichen Quellen wurde die immunologische Kreuzreaktion mit Mäuseantiserum, das gegen EF-Tu·GDP aus E.coli gebildet wurde, herangezogen. Bei Vorhandensein gemeinsamer immunologischer Determinanten

sollte wie bei EF-Tu·GDP aus E.coli Präzipitation eintreten.
Die Ausführung der Immunodiffusion ist in II.7.12.2. beschrieben. Wie Abbildung 24 A zu entnehmen ist, zeigt sich für EF-Tu aus E.coli auch bei geringen Mengen (2 µg) eine sehr deutliche Präzipitationslinie. Für die EF-Tus aus Actinomyceten konnten keine klaren Präzipitationslinien erhalten werden (Abbildung 24 B), auch nicht mit bis auf das zehnfache erhöhten Mengen an EF-Tu·GDP (nicht gezeigt). Zu Kontrollzwecken wurden die Elongationsfaktoren auch gegen das Serum einer nicht immunisierten Maus getestet (nicht gezeigt).
Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Elongationsfaktoren der Actinomyceten strukturelle Unterschiede, was die Antigeneigenschaften des Proteins betrifft, zu EF-Tu aus E.coli aufweisen.

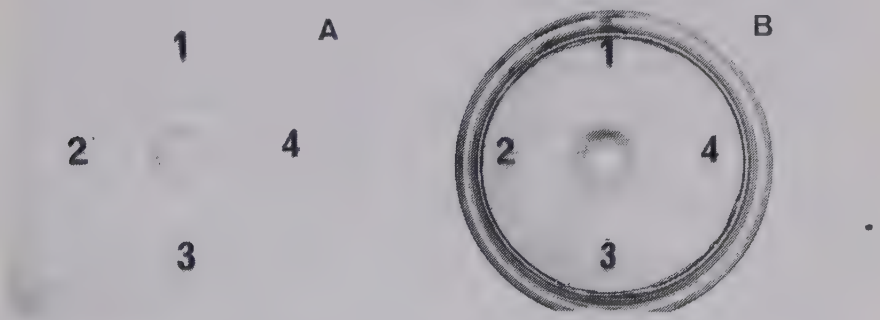


Abb. 24: Doppelte Immunodiffusion nach Ouchterlony

(A)
zentrales Loch: Mäuseantiserum gegen EF-Tu·GDP aus E.coli (380 µg), 1: EF-Tu·GDP aus E.coli (20 µg), 2: EF-Tu·GDP aus E.coli (4 µg), 3: EF-Tu·GDP aus E.coli (2 µg), 4: 0,9 % NaCl

(B)
zentrales Loch: Mäuseantiserum gegen EF-Tu·GDP aus E.coli (380 µg), 1: EF-Tu·GDP aus E.coli (2,4 µg), 2: EF-Tu·GDP (PIV) aus Sv.mobaraense (4 µg), 3: EF-Tu·GDP (PII) aus S.cinnamomeus (4 µg), 4: EF-Tu·GDP (PIII) aus S.lactamdurans (5 µg)

IV. D I S K U S S I O N

Bei der Suche nach neuen Antibiotika steht vor allem der Aspekt im Vordergrund, Substanzen zu finden, die für einen späteren Einsatz in der Medizin geeignet sind. Von der Vielzahl der isolierten und untersuchten Verbindungen kommt dafür letztendlich nur ein Bruchteil in Frage. Eine weitere Bedeutung können antibiotisch wirksame Substanzen in der Grundlagenforschung erhalten, indem sie als Hilfsmittel dienen für Untersuchungen biochemischer Vorgänge in Zielzellen oder auch Produzentenzellen. Kirromycin und Pulvomycin sind zwei Antibiotika, von deren Einsatz man sich Erkenntnisse verspricht, die zur weiteren Aufklärung struktureller und funktioneller Eigenschaften von EF-Tu und damit über den Gesamtablauf der Elongationsphase der Proteinbiosynthese in Prokaryonten führen.
Die Charakterisierung von EF-Tu aus E.coli ist in den letzten Jahren weit fortgeschritten, immer mehr Untersuchungen beschäftigen sich deshalb mit den Elongationsfaktoren anderer Organismen, von denen einige in Tabelle 4 aufgelistet sind. Abweichende Eigenschaften im Vergleich mit EF-Tu aus E.coli sollen die Forschung auf diesem Gebiet voranbringen.

Tabelle 4

Bakterien mit näher charakterisiertem EF-Tu

Bacillus stearothermophilus	WITTINGHOFER und LEBERMAN, 1976
Caldariella acidophila (= Sulfolobus solfataricus)	CAMMARANO et al., 1982
Caulobacter crescentus	STRINGFELLOW et al., 1980
Halobacterium cutirubrum	KESSEL und KLINK, 1981
Lactobacillus brevis	WÖRNER und WOLF, 1982
Streptomyces aureofaciens	WEISER et al., 1981
Streptomyces collinus	MIKULIK et al., 1982
Thermus thermophilus	OHTA et al., 1977 ARAI et al., 1978 und 1978a

Ein möglicher Unterschied kann in der Empfindlichkeit gegen Kirromycin und Pulvomycin liegen. Da EF-Tu aus E.coli gegen beide Antibiotika sensitiv ist, ist das Auftreten von resistenten Elongationsfaktoren eine gute Voraussetzung für weitergehende Charakterisierungen. Naheliegend ist, nach resistenten EF-Tus bei den Produzentenorganismen zu suchen, da sie sich auf irgendeine Weise vor der Wirkung ihres Produktes schützen müssen, und die Entwicklung eines resistenten Wirkorts eine Möglichkeit des Schutzes darstellt.
Die Untersuchung von EF-Tu aus dem Pulvomycinproduzenten Sv.mobaraense brachte dann das etwas überraschende Ergebnis einer natürlichen Kirromycinresistenz, während sich das Protein gegen Pulvomycin als sensitiv erwies. Daraufhin wurde die Betrachtung auf Produzentenstämme verschiedener Antibiotika der Kirromycingruppe und einige willkürlich ausgewählte Actinomyceten ausgedehnt. Anzumerken ist noch, daß die Derivate des Kirromycins vermutlich dasselbe Verhalten in der Wirkungsweise zeigen wie die Stammverbindung (PARMEGGIANI und SANDER, 1980), so daß die für Kirromycin gemachten Aussagen auch auf diese zutreffen, ausgenommen natürlich das Pulvomycin.

Durch Vergleich der Daten aus Tabelle 1 zeigt sich zunächst, daß sich die für die Mehrzahl der Organismen in vivo ermittelte geringe Empfindlichkeit gegenüber Kirromycin und Pulvomycin darauf zurückführen läßt, daß das Antibiotikum nicht zum Wirkort gelangt, was vermutlich an einer erschwerten oder gar nicht möglichen Aufnahme der Substanz liegt. Hinweise für das Auftreten von Enzymen, die nach einer erfolgten Aufnahme das Antibiotikum inaktivieren, gibt es nicht. Für kirromycinresistente Mutanten von E.coli wurden Versuche in diese Richtung unternommen, die die Existenz solcher inaktivierender Enzyme nicht bestätigen konnten (FISCHER, 1976; VAN DE KLUNDERT, 1978).
Im zellfreien System konnte dann neben der schon bekannten Wirkortresistenz von Sv.mobaraense gegen Kirromycin dasselbe Phänomen für die Elongationsfaktoren aus S.cinnamomeus, dem Kirrothricinproduzenten, und S.lactamdurans, dem Efrotomycinproduzenten, festgestellt werden. Auch gegen die beiden Kirromycinderivate besteht bei den drei Actinomyceten Wirkortresistenz.
Zusammenfassend ist zu sagen, daß sich zwei der untersuchten Produzentenstämme durch einen insensitiven Wirkort vor der toxischen Wirkung ihres Produktes schützen. Bei den übrigen Produzenten spielen wahrscheinlich Mechanismen, die mit den Permeabilitätseigenschaften der Zellwand zusammenhängen, die Hauptrolle. Es ist aber nicht auszuschließen, daß solche Vorgänge auch bei den wirkortresistenten Organismen wichtig sind.

Da die Antibiotika der Kirromycingruppe in die Proteinbiosynthese eingreifen,

erschien in diesem Zusammenhang wichtig festzustellen, ob eine Korrelation zwischen Proteinsynthese und der Antibiotikaproduktion besteht. Da es sich bei den Kirromycinen um recht komplizierte Moleküle handelt, könnte man annehmen, daß zu ihrer Biosynthese eine Reihe von Enzymen nötig ist, zu deren Bereitstellung eine vermehrte Proteinsynthese vor dem Beginn der Antibiotikaproduktion einsetzen müßte. Dies wäre eine Erklärung für den zeitlichen Zusammenhang der beiden Vorgänge, wie er für die Stämme S.cinnamomeus, S.collinus und S.lactamdurans ermittelt wurde. Beim Pulvomycinproduzenten Sv.mobaraense wäre es möglich, daß ein Anstieg der Proteinsynthese vor dem Einsetzen der Produktion des Antibiotikums erfolgt ist, aber durch den Test nicht mehr erfaßt wurde. Der starke Anstieg der Proteinsynthese, nachdem keine antibiotische Aktivität mehr feststellbar ist, ist aus den vorliegenden Erkenntnissen nicht zu erklären. Möglicherweise spielen Sporulationsvorgänge eine Rolle.

Zusätzlich zur Antibiotikaempfindlichkeit wurden Hitzestabilität und Molekulargewicht der verschiedenen EF-Tus untersucht. Die Molekulargewichte nehmen mit Werten zwischen 46 500 und 49 000 einen Platz ein zwischen dem für E.coli bestimmten von 43 225 (ARAI et al., 1980) und den höchsten bisher festgestellten bei Lactobacillen, nämlich 52 000 (WÖRNER et al., 1983). Der von MIKULIK et al. (1982) für S.collinus bestimmte Wert von 52 500 liegt vermutlich etwas zu hoch, da diese Autoren auch für EF-Tu aus E.coli ein um ca. 3 000 Dalton zu hohes Molekulargewicht erhalten. Stellt man dies in Rechnung, ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit dem hier erhaltenen Wert von 49 000. Erwähnenswert erscheint noch die Tatsache, daß bei der Auftrennung der Proteine der S 30-Extrakte in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese EF-Tu schon deutlich als stärkste Bande auftritt. Also auch in Actinomyceten macht der Elongationsfaktor einen hohen Anteil am Gesamtzellprotein aus.

Bei der Empfindlichkeit gegen Hitze lassen sich keine gravierenden Unterschiede zu EF-Tu aus E.coli feststellen. Die Fähigkeit zur Katalyse der Poly(Phe)-Synthese ist insgesamt bei allen untersuchten Organismen etwas hitzebeständiger als die GDP-Bindungsaktivität, was unter anderem zeigt, daß es sich hierbei um zwei getrennte Funktionen des Proteins handelt. Der bei weitem hitzelabilste EF-Tu wurde aus S.lactamdurans isoliert.

Für eine genauere Charakterisierung wurden nun die Elongationsfaktoren der drei kirromycinresistenten Stämme S.cinnamomeus, S.lactamdurans und Sv.mobaraense isoliert und gereinigt, um eventuelle weitere Abweichungen von Struktur und Funktion gegenüber EF-Tu aus E.coli zu finden.

Die Reinigung von EF-Tu aus Actinomyceten sollte im Rahmen dieser Arbeit nur der Beschaffung von Ausgangsmaterial für funktionelle Tests dienen, d. h. es wurde auf eine Optimierung der Reinigung für die einzelnen Elongationsfaktoren verzichtet. Als erstes Säulenmaterial wurde DEAE-Sepharose verwendet (LEBERMAN et al., 1980). Durch die guten Flußeigenschaften erübrigt sich eine Ultrazentrifugation zur Abtrennung der Ribosomen. Daran schloß sich eine Chromatographie an Phenyl-Sepharose an. Sie führte zwar zu keiner vollständigen Reinigung, die gelelektrophoretische Analyse zeigte jedoch mindestens 90 % Homogenität an, und da die spezifischen Aktivitäten der einzelnen Präparationen immer sehr niedrig waren, wurde auf eine Gelfiltration als dritten Reinigungsschritt verzichtet. Es hatte sich erwiesen, daß ein solcher Schritt keine erhebliche Verbesserung der Reinigung brachte, wohl aber teilweise große Aktivitätsverluste.

Schon während der Reinigung zeigten die drei EF-Tus aus Actinomyceten unterschiedliches Verhalten, vorallem im Elutionsprofil an DEAE-Sepharose. Bei S.lactamdurans ergaben sich zwei deutlich getrennte Peaks, nämlich EF-Tu·EF-Ts und EF-Tu·GDP. Bei Sv.mobaraense konnte nur ein Peak, vermutlich EF-Tu·EF-Ts festgestellt werden. Bei S.cinnamomeus müßte nach dem Elutionsvolumen das einzige Maximum ebenfalls EF-Tu·EF-Ts sein, allerdings konnte praktisch keine EF-Ts-Aktivität ermittelt werden. LEBERMAN et al. (1980) beobachteten bei der Verwendung von DEAE-Sepharose nur einen E.coli EF-Tu·GDP-Peak im Gegensatz zur Reinigung mit DEAE-Sephadex, wo zwei getrennte Peaks auftraten. Sie versuchten dieses Phänomen mit genügend hohen GDP/GTP-Konzentrationen im Zellextrakt zu erklären. WÖRNER (1982) erhielt bei der Chromatographie eines S 30-Extraktes aus Lactobacillus brevis an DEAE-Sepharose zwei Aktivitätsmaxima. Wie auch bei den für diese Arbeit durchgeführten Reinigungen hatte er den Säulenpuffern GDP zugesetzt, was eigentlich die Dissoziation eines EF-Tu·EF-Ts-Komplexes fördern sollte.

Das voneinander abweichende Elutionsverhalten läßt sich so deuten, daß man für die einzelnen EF-Tu·EF-Ts-Komplexe unterschiedliche Stabilität annimmt. Es besteht die Möglichkeit, daß eine Veränderung der Affinität zwischen EF-Tu und EF-Ts bei kirromycinresistenten Stämmen eventuell im Zusammenhang steht mit der Veränderung von EF-Tu, die die Resistenz gegen Kirromycin bedingt. Nach bisher vorliegenden Ergebnissen bei E.coli ist EF-Ts der einzige physiologische Effektor von EF-Tu, dessen Bindung kompetitiv zu der von Kirromycin ist. Das könnte auf ein Überlappen der beiden Bindungsstellen hindeuten, aber auch auf allosterischen Effekten beruhen (CHINALI et al., 1977; FASANO et al., 1978). In diesem Zusammenhang wäre interessant, das Verhalten von EF-Tu aus

kirromycinresistenten Mutanten von E.coli mit dem aus dem Wildtyp isolierten Protein bei der Reinigung über DEAE-Sepharose zu vergleichen. Leider liegen darüber keine Ergebnisse vor.

Es ist allerdings auch nicht ganz auszuschließen, daß die Qualität der verwendeten Zellen einen Einfluß auf die Mengenverteilung von EF-Tu·GDP und mit EF-Ts komplexiertem EF-Tu hat. PINGOUD und BLOCK (1981) erhalten zum Beispiel abhängig von den Fermentationsbedingungen für E.coli unterschiedliche Elutionsprofile von einer DEAE-Sepharose-Säule, wobei neben EF-Tu·GDP ein zweiter Peak auftritt, der als EF-Tu·ppGpp identifiziert wurde.

Die mit der Reinigung erreichten spezifischen Aktivitäten lagen mit 3 000 bis 5 000 U/mg erheblich unter den theoretisch erwarteten Werten von 20 000 bis 22 000 U/mg. Aufgrund der gelelektrophoretischen Analyse, die einen relativ hohen Reinheitsgrad anzeigt, muß angenommen werden, daß die Präparationen einen Großteil an inaktivem EF-Tu enthalten. Daher wurde für die Berechnung der EF-Tu-Mengen, die bei den Experimenten zur Charakterisierung eingesetzt wurden, die GDP-bindende Aktivität zugrunde gelegt, d. h. die Angabe 50 pMol EF-Tu bedeutet, daß die eingesetzte Proteinmenge im GDP-Bindungstest (II.7.1.) 50 pMol GDP gebunden hat. Bei den Angaben in mg handelt es sich stets um den Gesamtproteingehalt der Probe. Woran die nur geringen spezifischen Aktivitäten liegen, kann nicht entschieden werden. Durch Zusatz von PMSF als Inhibitor von Serinproteasen und EDTA, welches Metallionen-abhängige Proteasen hemmt (VALU und SZABO, 1978), müßte eine Inaktivierung durch Proteasen weitgehend unterdrückt sein. Auch ist diese Art von Reinigung verglichen mit anderen Methoden in relativ kurzer Zeit durchführbar, was sich eher positiv auf die Aktivität von EF-Tu auswirken sollte. Einen Einfluß auf die Aktivität kann weiterhin der Erntezeitpunkt der Zellen haben, wobei nicht nur die Wachstumsphase, in der sich die Bakterien befinden, eine Rolle spielt, sondern auch, wie schnell sie wachsen. Bei Lactobacillen liegen uns Ergebnisse vor, wo aus stationären Zellen kaum noch eine EF-Tu-Aktivität nachweisbar war. Allerdings zeigte EF-Tu aus stationären Zellen von Sv.mobaraense, die zum Zweck der Pulvomycinproduktion drei Tage lang fermentiert worden waren, durchaus vergleichbare GDP-Bindungsaktivität zu EF-Tu, der aus logarithmisch wachsenden Zellen isoliert wurde.

Ein Stabilitätsproblem ergab sich auch bei der Präparation von nukleotidfreiem EF-Tu. Die in II.7.11.1. beschriebene Methode wurde zuerst bei E.coli durchgeführt und lieferte bei Raumtemperatur gute Ergebnisse. Bei Sv.mobaraense führte diesselbe Vorgehensweise zu gravierenden Aktivitätsverlusten. Bei Wiederholung der Präparation im Kühlraum konnte das Ergebnis für die Elonga-

tionsfaktoren der Actinomyceten etwas verbessert werden. Aufgrund dieser Feststellungen wurde die Veränderung der GDP-Bindungsaktivität von EF-Tu·GDP aus E.coli und Sv.mobaraense bei kontinuierlichem Entzug von Magnesiumionen, der die Dissoziation des Nukleotids fördert, untersucht. Dabei wurden deutliche Unterschiede zwischen den beiden Proteinen sichtbar, die zeigen, daß der Actinomyceten-EF-Tu wesentlich empfindlicher auf den Mg^{2+}-Entzug reagiert als EF-Tu·GDP aus E.coli.

Auch gegenüber Hitze erwiesen sich die Faktoren der Actinomyceten, wie schon vorn erwähnt, als sensitiver.

Die Einwirkung des SH-Gruppenreagenz N-Ethylmaleimid hatte in Gegenwart von GDP keinen Einfluß auf die GDP-Bindungsaktivität, was dem bei EF-Tu·GDP aus E.coli gefundenen Verhalten entspricht, dessen Aktivität allerdings in Abwesenheit des Nukleotids gehemmt wird. Da durch die Schwierigkeiten bei der Präparation von nukleotidfreiem EF-Tu aus den Actinomyceten solcher nicht in ausreichender Menge bereitgestellt werden konnte, wurde darauf verzichtet, den Versuch mit nukleotidfreiem EF-Tu zu wiederholen. Daher kann nicht mit letztendlicher Sicherheit behauptet werden, daß die Faktoren aus den Actinomyceten sich vollständig gleich verhalten wie EF-Tu aus E.coli. Es besteht durchaus die Möglichkeit, daß bei der GDP-Bindung SH-Gruppen keine essentielle Rolle spielen, was bei Thermus thermophilus bestätigt ist, dessen EF-Tu keine freie Sulfhydrylgruppe enthält (KAZIRO, 1978; NAKAMURA et al., 1978). Eine eindeutige Hemmung der Poly(Phe)-Syntheseaktivität durch das SH-Gruppenreagenz bei S.cinnamomeus und Sv.mobaraense erlaubt die klare Aussage, daß für diese Funktion von EF-Tu wie bei E.coli eine SH-Gruppe wichtig ist, wobei diese nicht direkt an der Bindung der AA-tRNA beteiligt sein muß. Da bei EF-Tu aus S.lactamdurans auch mit erhöhten NEM-Mengen keine Beeinflussung der Aktivität zu bemerken war, kann man lediglich sagen, daß Unterschiede zu den anderen Faktoren bestehen. Worin die Abweichung begründet liegt, ob überhaupt keine SH-Gruppe nötig ist, oder ob diese durch den Test nur nicht erfaßt wird, kann nicht entschieden werden.

Auch bei der milden Trypsinolyse von EF-Tu·GDP bildet der Faktor aus S.lactamdurans eine Ausnahme. Sind die Spaltungsmuster von S.cinnamomeus und Sv.mobaraense dem von E.coli und anderer Bakterien vergleichbar, so scheinen bei S.lactamdurans die Bruchstücke B und C, die bei den anderen Organismen gegen weiteren Trypsinabbau stabil sind, für das Enzym zusätzliche Angriffsstellen zu bieten. Wie bei Lactobacillus brevis gezeigt wurde (WÖRNER, 1982), wird bei Verwendung von nukleotidfreiem EF-Tu Fragment B durch Trypsin weiter

abgebaut, was bedeutet, daß GDP eine Schutzfunktion ausübt. EF-Tu·GDP aus S.lactamdurans muß neben dem eventuell durch das Nukleotid geschützten Bereich noch mindestens einen weiteren trypsinempfindlichen Teil aufweisen. Die Beteiligung von Fragment B an der GDP-Bindung wird dadurch erhärtet, daß mit dem Abbau dieses Spaltstückes bei S.lactamdurans auch dessen Fähigkeit zur GDP-Bindung weitgehend verloren ist, wogegen sie bei den anderen Organismen erheblich weniger beeinträchtigt ist. Die Fähigkeit zur Poly(Phe)-Synthese wird bei den drei Actinomyceten schneller zerstört als bei E.coli, allerdings kann das anhand des Elektrophoresemusters nicht durch einen schnelleren Abbau von Fragment A erklärt werden, der laut WITTINGHOFER et al. (1980) für den Verlust der Poly(Phe)-Syntheseaktivität bei EF-Tu·GDP aus E.coli verantwortlich ist.
Die bisher diskutierten Unterschiede lassen vor allem für EF-Tu aus S.lactamdurans auf eine merklich veränderte Struktur gegenüber EF-Tu aus E.coli schließen.

Bei den Untersuchungen zur Wechselwirkung von EF-Tu mit Nukleotiden ergaben sich für S.cinnamomeus und Sv.mobaraense sowohl für EF-Tu·GDP, als auch für EF-Tu·GTP höhere Werte der Dissoziationskonstanten, als sie bisher bei anderen Organismen ermittelt wurden (Tabelle 5). Für S.lactamdurans liegt die Dissoziationskonstante für den EF-Tu·GDP-Komplex in vergleichbarer Größenordnung mit den Werten für E.coli. Die Affinität für GTP ist allerdings bei EF-Tu aus S.lactamdurans höher und ist vergleichbar mit der, die der kirromycinresistente EF-Tu aus der E.coli-Mutante D_{2216} aufweist. Die Schwierigkeiten bei der Bereitstellung von nukleotidfreiem EF-Tu aus den Actinomyceten in genügend großen Mengen hatte dazu geführt, daß die Dissoziationskonstanten für EF-Tu·GTP nicht mit Hilfe der Nitrocellulosefiltration direkt ermittelt wurden, sondern indirekt über Verdrängungsexperimente. Bei EF-Tu aus E.coli wurden zu Vergleichszwecken beide Methoden durchgeführt. Der Wert der Nitrocellulosefiltrationmethode stand dabei in guter Übereinstimmung mit bisher veröffentlichten Werten für E.coli, wogegen das Ergebnis des Verdrängungsexperiments stark abwich, was möglicherweise mit einer geringen GDP-Kontamination des verwendeten GTPs zu erklären ist. Somit könnten sich bei der Anwendung der "direkten" Methode auf die Faktoren der Actinomyceten doch noch starke Veränderungen der ermittelten Konstanten ergeben.

Tabelle 5

Dissoziationskonstanten verschiedener EF-Tu·Nukleotid-Komplexe

EF-Tu aus	bestimmt bei	K_d(nM) von EF-Tu·GDP	K_d(nM) von EF-Tu·GTP	$\frac{K_d(\text{EF-Tu·GTP})}{K_d(\text{EF-Tu·GDP})}$	Zitat
E.coli	20°C	3	300	100	(1)
E.coli	0°C	4,9	360	73	(2)
E.coli	30°C	5,5	580	105	(3)
E.coli	30°C	2	40	20	(4)
			300	150	
E.coli D_{2216}	0°C	1,2	73	61	(5)
L.brevis	30°C	3	20	7	(6)
B.stearothermophilus	5°C	10	330	33	(7)
T.thermophilus	0°C	1,1	58	53	(8)
S.cinnamomeus	30°C	29	870	30	(4)
S.lactamdurans	30°C	5	50	10	(4)
Sv.mobaraense	30°C	19	760	40	(4)

(1) MILLER und WEISSBACH, 1970; (2) ARAI et al., 1974; (3) FASANO et al., 1978; (4) diese Arbeit; (5) FASANO und PARMEGGIANI, 1981; (6) WÖRNER und WOLF, 1982; (7) ANTONSSON et al., 1981; (8) ARAI et al., 1978

Durch das abweichende Verhalten ihres EF-Tu gegenüber dem Antibiotikum Kirromycin im Vergleich zum entsprechenden Faktor aus E.coli waren die drei Actinomycetenstämme S.cinnamomeus, S.lactamdurans und Sv.mobaraense für eine weitere Bearbeitung ausgewählt worden. Mit Hilfe des säulenchromatographischen Verfahrens nach HUMMEL und DREYER (1962) konnte gezeigt werden, daß die Kirromycinresistenz darauf beruht, daß keine Bindung zwischen Antibiotikum und Protein stattfindet, bzw. so schwach ist, daß sie mit dieser Methode nicht mehr erfaßt wird. Für eine solche Veränderung in den Eigenschaften des Proteins genügt schon eine geringfügige Änderung in der Aminosäuresequenz, nämlich der Austausch einer Aminosäure, wie er für die kirromycinresistenten Mutanten von E.coli nachgewiesen wurde. Da keine erfaßbare Bindung von Kirromycin erfolgt, ist auch das Ausbleiben kirromycinbedingter Einflüsse auf

Einzelreaktionen von EF-Tu leicht erklärbar. So findet bei den Actinomyceten im Gegensatz zu E.coli ebensowenig eine Stimulierung des GDP-Austausches an EF-Tu, wie eine Induktion der GTPase-Aktivität statt.
Stellvertretend für die drei Actinomyceten wurde die Bindung von Pulvomycin an EF-Tu aus Sv.mobaraense nachgewiesen; allerdings scheint die Affinität geringer zu sein als bei E.coli, was sich wohl auch in der niedrigeren Empfindlichkeit in der zellfreien Proteinsynthese niederschlägt. Die Bestimmung der eingesetzten Pulvomycinkonzentration war über die Messung der Absorption bei 320 nm erfolgt. Jedoch scheint die Absorption kein exaktes Maß für die Wirkung des Pulvomycins auf EF-Tu zu sein, da verschiedene Pulvomycinpräparationen, für die vergleichbare Antibiotikakonzentrationen über die Absorption ermittelt wurden, bei ihrer Hemmwirkung auf EF-Tu-abhängige Reaktionen zum Teil Unterschiede bis zu einer Zehnerpotenz ergaben. Somit ist es angebracht, nicht die Absolutwerte der Ergebnisse zu vergleichen, sondern jeweils nur Vergleiche innerhalb einer Meßreihe anzustellen.
Neben der Hemmung der EF-Tu-abhängigen Poly(Phe)-Synthese durch Pulvomycin übt das Antibiotikum bei den Actinomyceten auch auf die Bildung des ternären Komplexes, die Stimulierung des GDP-Austausches und die GTPase-Aktivität einen mit E.coli vergleichbaren Einfluß aus. Die Induktion der GTPase-Aktivität von EF-Tu aus Sv.mobaraense ist allerdings verglichen mit der bei EF-Tu aus E.coli ermittelten schwach. Zu bemerken ist auch, daß EF-Tu aus Sv.mobaraense scheinbar einen geringeren Hydrolyseschutz für die Phe-tRNA bietet als EF-Tu aus E.coli. Dies könnte auf eine gewisse Veränderung in der Bindung zwischen EF-Tu und AA-tRNA hindeuten, die eine Herabsetzung der Affinität bei Sv.mobaraense bedingt. Eine deutliche Abweichung zeigt sich bei der EF-Tu-vermittelten Bindung von Phe-tRNA ans Ribosom, die bei E.coli durch genügend hohe Pulvomycinkonzentrationen gehemmt wird. Für die Actinomyceten war auch mit Pulvomycinkonzentrationen, die schon zur Hemmung der Poly(Phe)-Synthese führen, noch keine Inhibierung nachzuweisen. Da es sich bei der enzymatischen Bindung der AA-tRNA ans Ribosom um einen Teilschritt der Elongation handelt, müßte bei dem für Pulvomycin angenommenen Wirkungsmechanismus auch dieser Schritt bei Pulvomycinkonzentrationen, die die Gesamtreaktion verhindern, gehemmt sein. Die Diskrepanz ließe sich möglicherweise so erklären, daß der durch Pulvomycin veränderte ternäre Komplex der Actinomyceten noch in Wechselwirkung mit dem Ribosom treten kann, die weiteren Reaktionen aber verhindert sind.

Zur Untersuchung von möglichen strukturellen Homologien bei EF-Tu-Molekülen

aus verschiedenen Quellen wird häufig die immunologische Kreuzreaktion mit Antiserum gegen EF-Tu aus E.coli herangezogen. Allerdings ist zu beachten, daß aus einer solchen Kreuzreaktion nur geschlossen werden kann, daß gemeinsame (wenigstens zwei) Antigendeterminanten oder antigenreaktive Gebiete vorhanden sind, aber keine Rückschlüsse auf eine Strukturverwandtschaft des gesamten Proteins möglich sind (RUDOLPH, 1978). Für die aus Actinomyceten isolierten EF-Tus ist keine eindeutige Kreuzreaktion mit dem gegen EF-Tu aus E.coli erzeugten Mäuseantiserum nachzuweisen. EF-Tus der Actinomyceten S.collinus und S.aureofaciens zeigen eine Kreuzreaktion mit Kaninchenantiserum gegen EF-Tu aus E.coli (WEISER et al., 1981; MIKULIK et al., 1982; WEISER et al., 1982), ebenso wie der Elongationsfaktor aus dem thermoacidophilen Bacillus acidocaldarius (CAMMARANO et al., 1982). Für das thermophile Bakterium Thermus thermophilus konnten ARAI et al. (1978) keine immunologische Kreuzreaktion feststellen, auch bei Caulobacter crescentus ist das Ergebnis ebenso negativ wie für den aus dem Archaebakterium Caldariella acidophila isolierten EF-Tu (STRINGFELLOW et al., 1980; CAMMARANO et al., 1982).

Die bei den bisher untersuchten Bakterien gefundene Heterogenität der Elongationsfaktoren läßt sich nach den vorliegenden Ergebnissen für die getesteten EF-Tus aus Actinomyceten bestätigen. Auch innerhalb dieser Gruppe kommt es noch zu einigen Unterschieden struktureller und funktioneller Art, die besonders deutlich bei EF-Tu aus S.lactamdurans hervortreten.
Weitere Untersuchungen, die eine genaue Zuordnung der funktionellen Unterschiede zu einer eventuell veränderten Struktur des Proteins erlauben, sind nur auf molekularer Ebene möglich. Eine Veränderung der Primärstruktur des Faktors kann prinzipiell auf zwei Wegen geschehen, entweder die Veränderung liegt schon bei der DNA, oder es findet eine posttranslationelle Modifikation statt, wobei Methylierungen von EF-Tu aus E.coli und Salmonella typhimurium schon bekannt sind (OHBA et al., 1979; AMES und NIAKIDO, 1979; HIGGINS et al., 1981). Über die Funktion dieser Modifikationen liegen aber noch keine wesentlichen Erkenntnisse vor.
Die Kirromycinresistenz der beschriebenen E.coli-Mutanten ist in einer Veränderung des tuf-Gens begründet, wobei eines der beiden Gene inaktiviert wurde, da eine gleichzeitige Mutation beider autonomer Gene unwahrscheinlich ist. Sollten die in dieser Arbeit aufgefundenen Kirromycinresistenzen auch durch eine Veränderung im Gen bedingt sein, wäre die Tatsache, daß natürliche Kirromycinresistenz bei Eubakterien bisher nur bei gram-positiven Stämmen (Actinomyceten, Lactobacillen) festgestellt wurde, mit der Annahme, daß bei

diesen Bakterien nur ein tuf-Gen vorliegt, in guter Übereinstimmung.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Antibiotika der Kirromycingruppe hemmen die Proteinbiosynthese von Prokaryonten durch Wechselwirkung mit dem Elongationsfaktor Tu. Die Empfindlichkeit von vierzehn Actinomycetenstämmen gegen zwei dieser Antibiotika, Kirromycin und Pulvomycin, wurde sowohl in vivo, als auch in vitro untersucht. Es wurden zehn Produzentenstämme von Kirromycinantibiotika und zu Vergleichszwecken willkürlich vier Nichtproduzenten sowie E.coli gewählt. Dabei wurden drei gegen Kirromycin wirkortresistente Stämme entdeckt, Sv.mobaraense, S.cinnamomeus und S.lactamdurans, die Pulvomycin bzw. Kirrothricin oder Efrotomycin produzieren. Die beiden letztgenannten sind auch gegen ihr eigenes Produkt wirkortresistent, wogegen der Pulvomycinproduzent einen empfindlichen Elongationsfaktor besitzt und lediglich in vivo unempfindlich gegen das von ihm gebildete Antibiotikum ist.

Zur näheren Charakterisierung wurden die Elongationsfaktoren aus den drei genannten Stämmen über Ionenaustausch- und hydrophobe Chromatographie gereinigt. Die Proteine unterscheiden sich untereinander und von EF-Tu aus E.coli im Molekulargewicht. Die Empfindlichkeit gegen Hitze ist bei den Actinomyceten größer als bei E.coli. Durch Entzug von Magnesiumionen wird der EF-Tu aus Sv.mobaraense schneller inaktiviert als der entsprechende E.coli-Faktor. Bei der Behandlung mit einem SH-Gruppenreagenz und mit Trypsin traten bei S.lactamdurans erhebliche Unterschiede zu E.coli auf. So erfolgte keine Inaktivierung der Poly(Phe)-Syntheseaktivität durch NEM; die bei anderen Bakterien nicht mehr durch Trypsin spaltbaren Bruchstücke B und C werden weiter abgebaut, und die Fähigkeit zur GDP-Bindung geht damit verloren.
Weitere Unterschiede gibt es bei der Bindung von Nukleotiden, was sich in den Dissoziationskonstanten für GDP und GTP ausdrückt.
Bei allen drei EF-Tu aus Actinomyceten konnte keine Kirromycinbindung nachgewiesen werden. Pulvomycin zeigt bei den Actinomyceten eine ähnliche Wirkung auf die durch EF-Tu vermittelten Reaktionen wie bei E.coli. Lediglich bei der enzymatischen Bindung von Phe-tRNA ans Ribosom tritt im Gegensatz zu E.coli keine Hemmung auf. Auch ist die Stimulierung der GTPase-Aktivität durch Pulvomycin bei Sv.mobaraense weit geringer als bei E.coli.
Eine immunologische Kreuzreaktion mit Mäuseantiserum gegen EF-Tu aus E.coli konnte mit den Actinomyceten-EF-Tus nicht festgestellt werden.

VI. L I T E R A T U R

Akita, E., K. Maeda, H. Umezawa: Isolation and characterization of labilomycin, a new antibiotic. J. Antibiot. Ser. A 16, 147-151 (1963)

Allende, J.E., R. Monro, F. Lipmann: Resolution of the E.coli amino acyl sRNA transfer factor into two complementary fractions. Proc. Natl.,Acad. Sci. USA 51, 1211-1216 (1964)

Ames, G.F.-L., K. Niakido: In vivo methylation of prokaryotic elongation factor Tu. J. Biol. Chem. 254, 9947-9950 (1979)

Antonsson, B., H.R. Kalbitzer, A. Wittinghofer: The binding of nucleotides and metal ions to elongation factor Tu from Bacillus stearothermophilus as studied by equilibrium dialysis. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 735-743 (1981)

Antonsson, B., R. Leberman: Modification of amino groups in EF-Tu·GTP and the ternary complex EF-Tu·GTP·valyl-tRNA^{Val}. Eur. J. Biochem. 141, 483-487 (1984)

Arai, A.-I., M. Kawakita, Y. Kaziro: Studies on polypeptide elongation factors from Escherichia coli. II. Purification of factors Tu-guanosine diphosphate, Ts, and Tu-Ts, and crystallization of Tu-guanosine diphosphate and Tu-Ts. J. Biol. Chem. 247, 7029-7037 (1972)

Arai, K.-I., M. Kawakita, Y. Kaziro: Studies on the polypeptide elongation factors from E.coli. V. Properties of various complexes containing EF-Tu and EF-Ts. J. Biochem. 76, 293-306 (1974)

Arai, K.-I., M. Kawakita, S. Nakamura, I. Ishikawa, Y. Kaziro: Studies on the polypeptide elongation factors from E.coli. VI. Characterization of sulfhydryl groups in EF-Tu and EF-Ts. J. Biochem. 76, 523-534 (1974a)

Arai, K.-I., T. Arai, M. Kawakita, Y. Kaziro: Conformational transitions of polypeptide chain elongation factor Tu. I. Studies with hydrophobic probes. J. Biochem. 77, 1095-1106 (1975)

Arai, K.-I., T. Maeda, M. Kawakita, S.-I. Ohnishi, Y. Kaziro: Conformational transitions of polypeptide chain elongation factor Tu. II. Further studies by electron spin resonance. J. Biochem. 80, 1047-1055 (1976)

Arai, K.-I., S. Nakamura, T. Arai, M. Kawakita, Y. Kaziro: Limited hydrolysis of the polypeptide chain elongation factor Tu by trypsin. Isolation and characterization of the polypeptide fragments. J. Biochem. 79, 69-83 (1976a)

Arai, K.-I., T. Arai, M. Kawakita, Y. Kaziro: Further studies on the properties of the polypeptide chain elongation factors Tu and Ts: Hydrogen-tritium exchange, optical rotatory dispersion and intrinsic fluorescence. J. Biochem. 81, 1335-1346 (1977)

Arai, K.-I., N. Arai, S. Nakamura, T. Oshima, Y. Kaziro: Studies on polypeptide-chain-elongation factors from an extreme thermophile, Thermus thermophilus HB8. 2. Catalytic properties. Eur. J. Biochem. 92, 521-531 (1978)

Arai, K.-I., Y. Ota, N. Arai, S. Nakamura, C. Henneke, T. Oshima, Y. Kaziro: Studies on polypeptide-chain-elongation factors from an extreme thermophile, Thermus thermophilus HB8. 1. Purification and some properties of the purified factors. Eur. J. Biochem. 92, 509-519 (1978a)

Arai, K., B.F.C. Clark, L. Duffy, M.D. Jones, Y. Kaziro, R.A. Laursen, J. L' Italien, D.L. Miller, S. Nagarkatti, S. Nakamura, K.M. Nielsen, T.E. Petersen, K. Takahashi, M. Wade: Primary structure of elongation factor Tu from Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1326-1330 (1980)

Assmann, D., H. Wolf: Pulvomycin, an inhibitor of prokaryotic protein biosynthesis. Arch. Microbiol. 120, 297-299 (1979)

Beck, B.D., P.G. Arscott, A. Jacobson: Novel properties of bacterial elongation factor Tu. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1250-1254 (1978)

Beck, B.D.: Polymerization of the bacterial elongation factor for protein synthesis, EF-Tu. Eur. J. Biochem. 97, 495-502 (1979)

Beres, L., J. Lucas-Lenard: Studies on the fluorescence of the Y-base of yeast phenylalanine transfer ribonucleic acid. Effect of pH, aminoacylation,

and interaction with elongation factor Tu. Biochemistry 12, 3998-4002 (1973)

Berger, J., H.H. Lehr, S. Teitel, H. Maehr, E. Grunberg: A new antibiotic X-5108 of Streptomyces origin. I. Production, isolation and properties. J. Antibiot. 26, 15-22 (1973)

Biebricher, C.K., M. Druminski: Inhibition of RNA polymerase activity by the Escherichia coli protein biosynthesis elongation factor Ts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 866-869 (1980)

Blumenthal, T., T.A. Landers, K. Weber: Bacteriophage Qß replicase contains the protein biosynthesis elongation factors EF-Tu and EF-Ts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1313-1317 (1972)

Blumenthal, T., J. Douglass, D. Smith: Conformational alteration of protein synthesis elongation factor EF-Tu by EF-Ts and by kirromycin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3264-3267 (1977)

Böck, A.: Vortrag im Rahmen des Institutskolloquiums Mikrobiologie, Univ. Tübingen, 1985

Cammarano, P., A. Teichner, G. Chinali, P. Londei, M. de Rosa, A. Gambacorta, B. Nicolaus: Archaebacterial elongation factor Tu insensitive to pulvomycin and kirromycin. FEBS Lett. 148, 255-259 (1982)

Chau, V., G. Romero, R.L. Biltonen: Kinetic studies on the interactions of Escherichia coli K 12 elongation factor Tu with GDP and elongation factor Ts.. J. Biol. Chem. 256, 5591-5596 (1981)

Chinali, G., H. Wolf, A. Parmeggiani: Effect of kirromycin on elongation factor Tu. Location of the catalytic center for ribosome-elongation-factor-Tu GTPase activity on the elongation factor. Eur. J. Biochem. 75, 55-65 (1977)

Chinali, G.: Identification of the part of kirromycin structure that acts on elongation factor Tu. FEBS Lett. 131, 94-98 (1981)

Colowick, S.P., F.C. Womack: Binding of diffusible molecules by macromolecules: Rapid measurements by rate of dialysis. J. Biol. Chem. 244, 774-777 (1969)

Crane, L.J., D.L. Miller: Guanosine triphosphate and guanosine diphosphate as conformation-determining molecules. Differential interaction of a fluorescent probe with the guanosine nucleotide complexes of bacterial elongation factor Tu. Biochemistry 13, 933-939 (1974)

Cundliffe, E., R.H. Skinner, J. Thompson: Resistance to antibiotics in antibiotic-producing organisms. In: Biological, biochemical, and biomedical aspects of actinomycetes. L. Ortiz-Ortiz, L.F. Bojalil, V. Yakoleff (eds.), S. 303-314. Academic Press, Orlando, Florida, USA, 1984

Demain, A.L.: How do antibiotic-producing microorganisms avoid suicide? Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 601-612 (1974)

Duffy, L.K., L. Gerber, A.E. Johnson, D.L. Miller: Identification of a histidine residue near the aminoacyl transfer ribonucleic acid binding site of elongation factor Tu. Biochemistry 20, 4663-4666 (1981)

Duisterwinkel, F.J., J.M. de Graaf, B. Kraal, L. Bosch: A kirromycin resistant elongation factor EF-Tu from Escherichia coli contains a threonine instead of an alanine residue in position 375. FEBS Lett. 131, 89-93 (1981)

Duisterwinkel, F.J., B. Kraal, J.M. de Graaf, A. Talens, L. Bosch, G.W.M. Swart, A. Parmeggiani, T.F.M. la Cour, J. Nyborg, B.F.C. Clark: Specific alterations of the EF-Tu polypeptide chain considered in the light of its three-dimensional structure. Embo J. 3, 113-120 (1984)

Ertel, R., N. Brot, B. Redfield, J.E. Allende, H. Weissbach: Binding of guanosine 5'-triphosphate by soluble factors required for polypeptide synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 861-868 (1968)

Ertel, R., B. Redfield, N. Brot, H. Weissbach: Role of GTP in protein synthesis: Interaction of GTP with soluble transfer factors from E.coli. Arch. Biochem. Biophys. 128, 331-338 (1968a)

Fairbanks, G., T.C. Steck, D.F.H. Wallach: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry 10, 2606-2617 (1971)

Fasano, O., W. Bruns, J.-B. Crechet, G. Sander, A. Parmeggiani: Modification of elongation-factor-Tu·guanine-nucleotide interaction by kirromycin. A. Comparison with the effect of AA-tRNA and elongation factor Ts. Eur. J. Biochem. 89, 557-565 (1978)

Fasano, O., A. Parmeggiani: Altered regulation of the guanosine 5'-triphosphatase activity in a kirromycin-resistant elongation factor Tu. Biochemistry 20, 1361-1366 (1981)

Filer, D., A.V. Furano: Portions of the gene encoding elongation factor Tu are highly conserved in prokaryotes. J. Biol. Chem. 255, 728-734 (1980)

Filer, D., R. Dhar, A.V. Furano: The conservation of DNA sequences over very long periods of evolutionary time. Evidence against intergeneric chromosomal transfer as an explanation for the presence of Escherichia coli tuf gene sequences in taxonomically-unrelated prokaryotes. Eur. J. Biochem. 120, 69-77 (1981)

Filer, D., A.V. Furano: Duplication of the tuf gene, which encodes peptide chain elongation factor Tu, is widespread in gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 148, 1006-1011 (1981)

Fischer, E.: Selektion und Charakterisierung einer Kirromycin resistenten Mutante von E.coli D22 mit verändertem Elongationsfaktor Tu. Dissertation, Univ. Tübingen (1976)

Fischer, E., H. Wolf, K. Hantke, A. Parmeggiani: Elongation factor Tu resistant to kirromycin in an Escherichia coli mutant altered in both tuf genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4341-4345 (1977)

Fischer, E., H. Wolf: Interaction between the antibiotic pulvomycin and the ternary complex AA-tRNA·EF-Tu·GTP. Poster Abstract in Regard sur la Biochimie 3, 57 (1981)

Furano, A.V.: Content of elongation factor Tu in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4780-4784 (1975)

Furano, A.V.: The elongation factor Tu coded by the tuf A gene of Escherichia

coli K-12 is almost identical to that coded by the tuf B gene. J. Biol. Chem. 252, 2154-2157 (1977)

Gast, W.H., R. Leberman, G.E. Schulz, A. Wittinghofer: Crystals of partially trypsin-digested elongation factor Tu. J. Mol. Biol. 106, 943-950 (1976)

Gordon, J.: A stepwise reaction yielding a complex between a supernatant fraction from E.coli, guanosine 5'-triphosphate, and aminoacyl-sRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 179-183 (1968)

Grajevskaja, R.A., Y.V. Ivanov, E.M. Saminsky: 70 S ribosomes of Escherichia coli have an additional site for deacylated tRNA binding. Eur. J. Biochem. 128, 47-52 (1982)

Gullo, V.P., S.B. Zimmerman, R.S. Dewey, O. Hensens, P.J. Cassidy: Factumycin, a new antibiotic (A40A): Fermentation, isolation and antibacterial spectrum. J. Antibiot. 35, 1705-1707 (1982)

Higgins, W., G. Grove, C. Tardiff: Methylation of protein elongation factor Tu. Poster Abstract in Regard sur la Biochimie 3, 55 (1981)

Hummel, J.P., W.J. Dreyer: Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration. Biochem. Biophys. Acta 63, 530-532 (1962)

Jacobson, G.R., J.P. Rosenbusch: Abundance and membrane association of elongation factor Tu in E.coli. Nature 261, 23-26 (1976)

Jacobson, G.R., J.P. Rosenbusch: A functionally active tryptic fragment of Escherichia coli elongation factor Tu. Biochemistry 15, 5105-5110 (1976a)

Jacobson, G.R., B.J. Takacs, J.P. Rosenbusch: Properties of a major protein released from Escherichia coli by osmotic shock. Biochemistry 15, 2297-2303 (1976)

Jacobson, G.R., J.P. Rosenbusch: Affinity purification of elongation factors Tu and Ts. FEBS Lett. 79, 8-10 (1977)

Jacobson, G.R., J.P. Rosenbusch: Limited proteolysis of elongation factor Tu

from Escherichia coli. Multiple intermediates. Eur. J. Biochem. 77, 409-417 (1977a)

Jaskunas, S.R., L. Lindahl, M. Nomura, R.R. Burgess: Identification of two copies of the gene for elongation factor EF-Tu in E.coli. Nature 257, 458-462 (1975)

Jonák, J., I. Rychlik: Chemical evidence for the involvement of histidyl residues in the functioning of Escherichia coli elongation factor Tu. FEBS Lett. 117, 167-171 (1980)

Jones, M.D., T.E. Petersen, K.M. Nielsen, S. Magnusson, L. Sottrup-Jensen, K. Gausing, B.F.C. Clark: The complete amino-acid sequence of elongation factor Tu from Escherichia coli. Eur. J. Biochem. 108, 507-526 (1980)

Jongsma, H.M., H.J. Kooreman, J.L. van Os, C. Vos: Dihydromocimycin and its salts with acids. Chem. Abstr. 86, 119248 (1977)

Jurnak, F., A. McPherson, A.H.J. Wang, A. Rich: Biochemical and structural studies of the tetragonal crystalline modification of the Escherichia coli elongation factor Tu. J. Biol. Chem. 255, 6751-6757 (1980)

Kabsch, W., W.H. Gast, G.E. Schulz, R. Leberman: Low resolution structure of partially trypsin-degraded polypeptide elongation factor, EF-Tu, from Escherichia coli. J. Mol. Biol. 117, 999-1012 (1977)

Kavanagh, F.: Analytical microbiologie. Academic Press, New York, USA, 1963

Kaziro, Y.: The role of guanosine 5'-triphosphate in polypeptide chain elongation. Biochim. Biophys. Acta 505, 95-127 (1978)

Kessel, M., F. Klink: Two elongation factors from the extremely halophilic archaebacterium Halobacterium cutirubrum. Assay systems and purification at high salt concentrations. Eur. J. Biochem. 114, 481-486 (1981)

Kraal, B., B.S. Hartley: Reactivity of amino groups in various complexes of the peptide chain elongation factor EF-Tu from Escherichia coli. A new method of competitive labelling using reductive methylation. J. Mol. Biol. 124, 551-

564 (1978)

Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685 (1970)

Landers, T.A., T. Blumenthal, K. Weber: Function and structure in ribonucleic acid phage Qß ribonucleic acid replicase. The roles of the different subunits in transcription of synthetic templates. J. Biol. Chem. 249, 5801-5808 (1974)

Leberman, R., B. Antonsson, R. Giovanelli, R. Guariguata, R. Schumann, A. Wittinghofer: A simplified procedure for the isolation of bacterial polypeptide elongation factor EF-Tu. Anal. Biochem. 104, 29-36 (1980)

Leberman, R.: Polypeptide elongation factor Tu: Observations on the interaction with DNase I and the aggregation at pH 6. FEBS Lett. 176, 313-316 (1984)

Liu, C.-M., T. Hermann, P.A. Miller: Feedback inhibition of the synthesis of an antibiotic: Aurodox (X-5108). J. Antibiot. 30, 244-251 (1977)

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall: Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

Lucas-Lenard, J., F. Lipmann: Separation of three microbial amino acid polymerization factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55, 1562-1566 (1966)

Mann, C.K., J.H. Yoe: Spectrophotometric determination of magnesium with sodium 1-azo-2-hydroxy-3-(2,4-dimethylcarboxanilido)-naphthalene-1'-(2-hydroxybenzene-5-sulfonate). Anal. Chem. 28, 202-205 (1956)

Marschel, A.H., J.W. Bodley: Inactivation of Escherichia coli elongation factor Tu by the arginine-specific reagent butanedione. Arch. Biochem. Biophys. 203, 489-495 (1980)

Maurer, K.-H., F. Pfeiffer, H. Zehender, D. Mecke: Characterization of two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes from the pentalenolactone producer S.arenae. J. Bacteriol. 153, 930-936 (1983)

Mayer, R.J., J.H. Walker: Techniques in enzyme and protein immunochemistry.

In: Techniques in protein and enzyme biochemistry. B 119, S. 1-32. Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, 1978

Mikulik, K., J. Weiser, D. Hasková: Protein synthesis elongation factor EF-Tu from Streptomyces collinus producing kirromycin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 108, 861-867 (1982)

Miller, D.L., H. Weissbach: An interaction between the transfer factors required for protein synthesis. Arch. Biochem. Biophys. 132, 146-150 (1969)

Miller, D.L., H. Weissbach: Interactions between the elongation factors: The displacement of GDP from the Tu·GDP complex by factor Ts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 1016-1022 (1970)

Miller, D.L., H. Weissbach: Studies on the purification and properties of factor Tu from E.coli. Arch. Biochem. Biophys. 141, 26-37 (1970a)

Miller, D.L., J. Hachmann, H. Weissbach: The reactions of the sulfhydryl groups on the elongation factors Tu and Ts. Arch. Biochem. Biophys. 144, 115-121 (1971)

Miller, D.L., M. Cashel, H. Weissbach: The interaction of guanosine 5'-diphosphate-2'(3')-diphosphate with the bacterial elongation factor Tu. Arch. Biochem. Biophys. 154, 675-682 (1973)

Miller, D.L., H. Weissbach: Elongation factor Tu and the aminoacyl-tRNA·EF-Tu·GTP complex. In: Methods in enzymology. K. Moldave, L. Grossman (eds.), Vol. XXX, S. 219-232. Academic Press, New York, USA, 1974

Miyajima, A., M. Shibuya, Y. Kaziro: Construction and characterization of the two hybrid ColE1 plasmids carrying Escherichia coli tuf B gene. FEBS Lett. 102, 207-210 (1979)

Miyajima, A., Y. Kaziro: The expression of the cloned tuf B gene in vivo. FEBS Lett. 119, 215-218 (1980)

Morikawa, K., T.F.M. la Cour, J. Nyborg, K.M. Rasmussen, D.L. Miller, B.F.C. Clark: High resolution X-ray crystallographic analysis of a modified form of

the elongation factor Tu:guanosine diphosphate complex. J. Mol. Biol. 125, 325-338 (1978)

Nakamura, S., S. Ohta, K.-I. Arai, N. Arai, T. Oshima, Y. Kaziro: Studies on polypeptide-chain-elongation factors from an extreme thermophile, Thermus thermophilus HB8. 3. Molecular properties. Eur. J. Biochem. 92, 533-543 (1978)

Nimeck, M.W., E. Meyers, W.C. Liu: Antibiotic azdimycin. Chem. Abstr. 83, 191341 (1975)

Nirenberg, M.W., J. Matthaei: The dependence of cell-free protein synthesis in E.coli upon naturally occuring or synthetic polyribonucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47, 1588-1602 (1961)

Nishizuka, Y., F. Lipmann: Comparison of guanosine triphosphate split and polypeptide synthesis with a purified E.coli system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55, 212-219 (1966)

Ohba, M., O. Koiwai, S. Tanada, H. Hayashi: In vivo methylation of elongation factor Tu of Escherichia coli. J. Biochem. 86, 1233-1238 (1979)

Ohta, S., M. Nakanishi, M. Tsuboi, K.-I. Arai, Y. Kaziro: Structural fluctuation of the polypeptide-chain elongation factor Tu. A comparison of factors from Escherichia coli and Thermus thermophilus HB8. Eur. J. Biochem. 78, 599-608 (1977)

Ouchterlony, Ö.: Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Handbook of experimental immunology. D.M. Weir (ed.), Blackwell Sci. Publications, Oxford, England, 1967

Parmeggiani, A., C. Singer, E.M. Gottschalk: Purification of the amino acid polymerization factors from Escherichia coli. In: Methods in enzymology. K. Moldave, L. Grossman (eds.), Vol. XX, S. 291-302. Academic Press, New York, USA, 1971

Parmeggiani, A., G. Sander: Properties and action of kirromycin (mocimycin) and related antibiotics. In: Topics in antibiotic chemistry. P.G. Sammes (ed.) Vol. 5, S. 159-221. Wiley and Sons, Chichester, England, 1980

Pingoud, A., C. Urbanke, G. Krauss, F. Peters, G. Maass: Ternary complex formation between EF-Tu, GTP and aminoacyl-tRNA: an equilibrium study. Eur. J. Biochem. 78, 403-409 (1977)

Pingoud, A., C. Urbanke: Aminoacyl transfer ribonucleic acid binding site of the bacterial elongation factor Tu. Biochemistry 19, 2108-2112 (1980)

Pingoud, A., W. Block: The elongation factor Tu·guanosine tetraphosphate complex. Eur. J. Biochem. 116, 631-634 (1981)

Pingoud, A., W. Block, A. Wittinghofer, H. Wolf, E. Fischer: The elongation factor Tu binds aminoacyl-tRNA in the presence of GDP. J. Biol. Chem. 257, 11261-11267 (1982)

Pingoud, A., W. Block, C. Urbanke, H. Wolf: The antibiotics kirromycin and pulvomycin bind to different sites on the elongation factor Tu from E.coli. Eur. J. Biochem. 123, 261-265 (1982a)

Ravel, J.M., R.L. Shorey, S. Froehner, W. Shive: A study of the enzymic transfer of aminoacyl-tRNA to Escherichia coli ribosomes. Arch. Biochem. Biophys. 125, 514-526 (1968)

Rheinberger, H.-J., H. Sternbach, K.H. Nierhaus: Three tRNA binding sites on Escherichia coli ribosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5310-5314 (1981)

Rheinberger, H.-J., K.H. Nierhaus: Testing an alternative model for the ribosomal peptide elongation cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4213-4217 (1983)

Römer, R., W. Block, A. Pingoud, H. Wolf: A ^{1}H-NMR study of the Escherichia coli elongation factor Tu with guanine nucleotides and the antibiotic kirromycin. FEBS Lett. 126, 161-164 (1981)

Rosenbusch, J.P., G.R. Jacobson, J.-C. Jaton: Does a bacterial elongation factor share a common evolutionary ancestor with actin? J. Supramol. Struct. 5, 391-396 (1976)

Rubin, J.R., K. Morikawa, J. Nyborg, T.F.M. la Cour, B.F.C. Clark, D.L. Miller: Structural features of the GDP binding site of elongation factor Tu from

Escherichia coli as determined by X-ray diffraction. FEBS Lett. 129, 177-179 (1981)

Rudolph, W.: Antigene: Proteine als Antigene. In: Grundriß der Immunbiologie. H. Ambrosius, W. Rudolph (eds.), S. 62-64. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, DDR, 1978

Scatchard, G.: The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. NY Acad. Sci. 51, 660-667 (1949)

Schilstra, M.J., J.W. Slot, P.H. van der Meide, G. Postuma, A.F.M. Cremers, L. Bosch: Immunocytochemical localization of the elongation factor Tu in E.coli cells. FEBS Lett. 165, 175-179 (1984)

Schwartz, J.L., M. Tishler, B.H. Arison, H.M. Shafer, S. Omura: Identification of mycolutein and pulvomycin as aureothin and labilomycin respectively. J. Antibiot. 29, 236-241 (1976)

Shibuya, M., H. Nashimoto, Y. Kaziro: Cloning of an EcoRI fragment carrying E.coli tuf A gene. Molec. Gen. Genet. 170, 231-234 (1979)

Shorey, R.L., J.M. Ravel, C.W. Garner, W. Shive: Formation and properties of the aminoacyl transfer ribonucleic acid-guanosine triphosphate-protein complex. An intermediate in the binding of aminoacyl transfer ribonucleic acid to ribosomes. J. Biol. Chem. 244, 4555-4564 (1969)

Shulman, R.G., C.W. Hilbers, D.L. Miller: Nuclear magnetic resonance studies of protein - RNA interactions. I. The elongation factor Tu·GTP·aminoacyl-tRNA complex. J. Mol. Biol. 90, 601-607 (1974)

Smith, I., P. Paress: Genetic and biochemical characterization of kirromycin resistance mutations in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 135, 1107-1117 (1978)

Staehelin, T., D.R. Maglott: Preparation of Escherichia coli ribosomal subunits active in polypeptide synthesis. In: Methodes in enzymology. K. Moldave, L. Grossman (eds.), Vol. XX, S. 449-456. Academic Press, New York, USA, 1971

Stapley, E.O., M. Jackson, S. Hernandez, S.B. Zimmerman, S.A. Currie, S. Mo-

chales, J.M. Mata, H.B. Woodruff, D. Hendlin: Cephamycins, a new family of ß-lactam antibiotics. I. Production by actinomycetes, including Streptomyces lactamdurans sp.n. Antimicrob. Agents Chemother. 2, 122-131 (1972)

Stringfellow, L.A., J. Douglass, T. Blumenthal: Protein synthesis elongation factors Tu and Tu·Ts from Caulobacter crescentus: Sensitivity to kirromycin and activity in Qß replicase. J. Bacteriol. 143, 389-395 (1980)

Stulberg, M.P.: The isolation and properties of phenylalanyl ribonucleic acid synthetase from Escherichia coli B. J. Biol. Chem. 242, 1060-1064 (1967)

Swart, G.W.M., B. Kraal, L. Bosch, A. Parmeggiani: Allosteric changes of the guanine nucleotide sites of elongation factor EF-Tu. A comparative study of two kirromycin-resistant EF-Tu species. FEBS Lett. 142, 101-106 (1982)

Thein-Schranner, I., H. Zähner, H.-U. Hoppe, I. Hummel, A. Zeeck: Metabolic products of microorganisms. 209. Kirrothricin, a new member of the kirromycin-group. J. Antibiot. 35, 948-956 (1982)

Tiboni, O., G. di Pasquale, O. Ciferri: Two tuf genes in the cyanobacterium Spirulina platensis. J. Bacteriol. 159, 407-409 (1984)

Tissières, A., J.D. Watson, D. Schlessinger, B.R. Hollingworth: Ribonucleoprotein particles from Escherichia coli. J. Mol. Biol. 1, 221-233 (1959)

Travers, A.: Control of ribosomal RNA synthesis in vitro. Nature 244, 15-18 (1973)

Valu, G., G. Szabo: The effect of endogenous proteolytic activity on the in vitro [^{14}C]-Phenylalanine incorporation in Streptomyces griseus. In: Nocardia and Streptomyces. M. Mordarski, W. Kurytowicz, J. Jeljaszewicz (eds.), S. 409-413. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1978

Van de Klundert, J.A.M.: Mutants of Escherichia coli altered in the elongation factor EF-Tu. Dissertation, Univ. Leiden, Niederlande (1978)

Van de Klundert, J.A.M., P.H. van der Meide, P. van de Putte, L. Bosch: Mutants of Escherichia coli altered in both genes coding for the elongation

factor Tu. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4470-4473 (1978)

Van der Meide, P.H., T.H. Borman, A.M.A. Kimmenade, P. van de Putte, L. Bosch: Elongation factor Tu isolated from Escherichia coli mutants altered in tuf A and tuf B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3922-3926 (1980)

Van Ooyen, A.J.J., M. Gruber, M. + P. Jørgensen: The mechanism of action of ppGpp on rRNA synthesis in vitro. Cell 8, 123-128 (1976)

Vining, L.C.: Antibiotic tolerance in producer organisms. Adv. Appl. Microbiol. 25, 147-168 (1979)

Voorma, H.O., R. Benne, T.J.A. den Hertog: Binding of amino-acyl-tRNA to ribosomes programmed with bacteriophage MS2 RNA. Eur. J. Biochem. 18, 451-462 (1971)

Vos, C.: Antibiotic MYC 8003. Chem. Abstr. 77, 32742 (1972)

Wasiliu, M.: Kirromycin- und Pulvomycin-resistenter Elongationsfaktor Tu aus Lactobacillus acidophilus. Diplomarbeit, Univ. Tübingen (1983)

Wax, R., W. Maiese, R. Weston, J. Birnbaum: Efrotomycin, a new antibiotic from Streptomyces lactamdurans. J. Antibiot. 29, 670-673 (1976)

Weber, K., M. Osborn: The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969)

Weiser, J., K. Mikulik, L. Bosch: Studies on the elongation factor Tu from Streptomyces aureofaciens producing tetracycline. Biochem. Biophys. Res. Commun. 99, 16-22 (1981)

Weiser, J., K. Mikulik, Z. Zizka, J. Stastna, I. Janda, A. Jiranova: Isolation and characterization of Streptomyces aureofaciens protein-synthesis elongation factor Tu in an aggregated state. Eur. J. Biochem. 129, 127-132 (1982)

Weissbach, H., B. Redfield, H.R. Kaback: Nucleotide binding by Escherichia coli membranes and solubilized membrane proteins. Arch. Biochem. Biophys. 135,

66-74 (1969)

Wesseling, A.C., B.D. Lago: Strain improvement by genetic recombination of cephamycin producers, Nocardia lactamdurans and Streptomyces griseus. Dev. Ind. Microbiol. 22, 641-651 (1981)

Wilson, G.E., M. Cohn, D. Miller: Magnetic resonance studies of interactions of spin-labeled elongation factor Tu with ligands. J. Biol. Chem. 253, 5764-5768 (1978)

Wittinghofer, A., R. Leberman: Elongation factor T from Bacillus stearothermophilus and Escherichia coli. Purification and some properties of EF-Tu and EF-Ts from Bacillus stearothermophilus. Eur. J. Biochem. 62, 373-382 (1976)

Wittinghofer, A., W.F. Warren, R. Leberman: Structural requirements of the GDP binding site of elongation factor Tu. FEBS Lett. 75, 241-243 (1977)

Wittinghofer, A., R. Leberman: A sulfhydryl group is not essential for the binding of GDP to elongation factor Tu. FEBS Lett. 101, 153-156 (1979)

Wittinghofer, A., R. Frank, R. Leberman: Composition and properties of trypsin-cleaved elongation factor Tu. Eur. J. Biochem. 108, 423-431 (1980)

Wörner, W.: Heterogenität der Elongationsfaktoren bei Eubakterien - eine strukturelle und funktionelle Charakterisierung. Dissertation, Univ. Tübingen (1982)

Wörner, W., H. Wolf: Kirromycin-resistant elongation factor Tu from wild-type of Lactobacillus brevis. FEBS Lett. 146, 322-326 (1982)

Wörner, W., C. Glöckner, M. Mierzowski, H. Wolf: On heterogenity of elongation factor Tu among eubacteria. FEMS Microbiol. Lett. 18, 69-73 (1983)

Wolf, H., H. Zähner: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 99. Mitteilung: Kirromycin. Arch. Mikrobiol. 83, 147-154 (1972)

Wolf, H., G. Chinali, A. Parmeggiani: Kirromycin, an inhibitor of protein biosynthesis that acts on elongation factor Tu. Proc. Natl. Acad. Sci. USA

71, 4910-4914 (1974)

Wolf, H., D. Assmann, E. Fischer: Pulvomycin, an inhibitor of protein biosynthesis preventing ternary complex formation between elongation factor Tu, GTP, and aminoacyl-tRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5324-5328 (1978)

Wolf, H., E. Fischer: Kirromycin and related antibiotics. In: Antibiotics VI: Modes and mechanisms of microbial growth inhibitors. F.E. Hahn (ed.), S. 71-89. Gustav Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1983

Wurtz, M., G.R. Jacobson, A.C. Steven, J.P. Rosenbusch: Paracrystalline arrays of protein-synthesis elongation factor Tu. Comparison with polymerized actin. Eur. J. Biochem. 88, 593-597 (1978)

Zief, M., R. Woodside, H. Schmitz: Pulvomycin. Antibiot. Chemother. 7, 384-389 (1957)

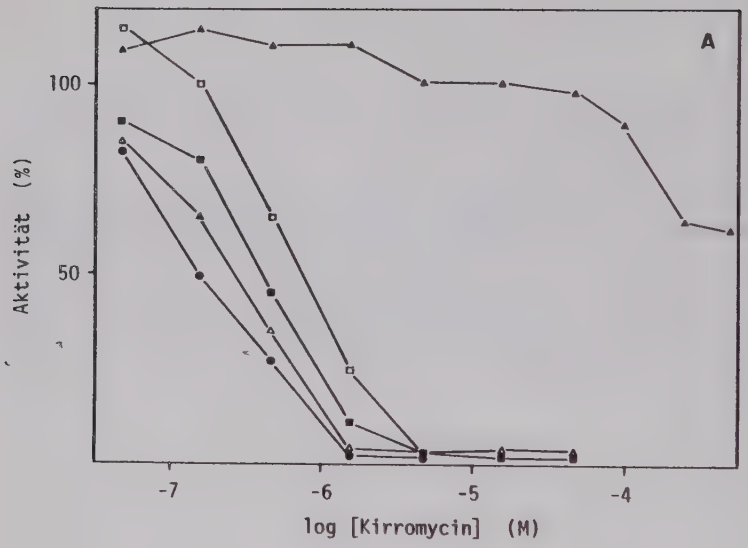
Zimmerman, S.B., J.H. Chalmers, Jr., R.S. Dewey, E.O. Stapley: Heneicomycin, a new antibiotic (A21A): Fermentation, isolation, and antibacterial spectrum. J. Antibiot. 32, 665-666 (1979)

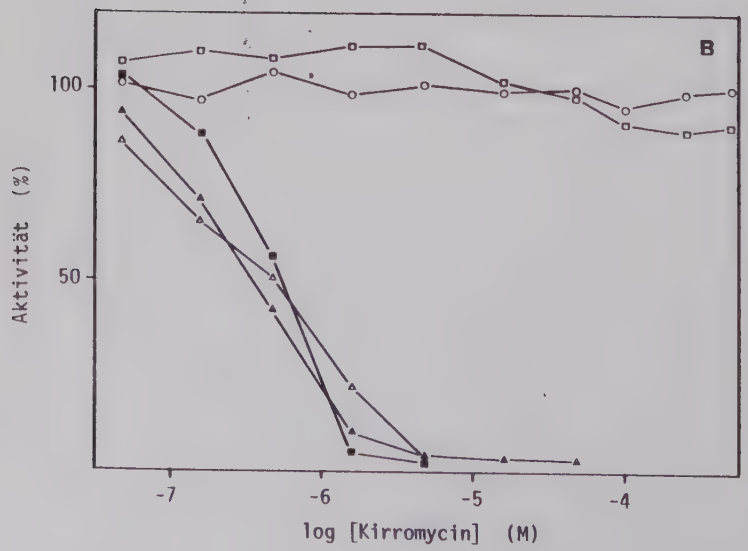
VII. A N H A N G

Zu Tabelle 1

Hemmung der Poly(U)-abhängigen Poly(Phe)-Synthese durch Kirromycin, Pulvomycin, Kirrothricin und Efrotomycin.

Die Durchführung der Poly(Phe)-Synthese erfolgte wie in II.7.3. beschrieben. Die Wirkung der Antibiotika wurde im definierten E.coli-System untersucht, wobei EF-Tu·GDP aus E.coli durch die entsprechenden partiell gereinigten Faktoren aus den angegebenen Actinomyceten ersetzt wurde.
Die Angaben in den Abbildungen beziehen sich auf den Einbau von [^{14}C]Phenylalanin in Trichloressigsäure-unlösliches Poly(Phe) in Abwesenheit der Antibiotika (100 %).


A
100
50
Aktivität (%)
-7
-6
-5
-4
log [Kirromycin] (M)


B
100
50
Aktivität (%)
-7
-6
-5
-4
log [Kirromycin] (M)

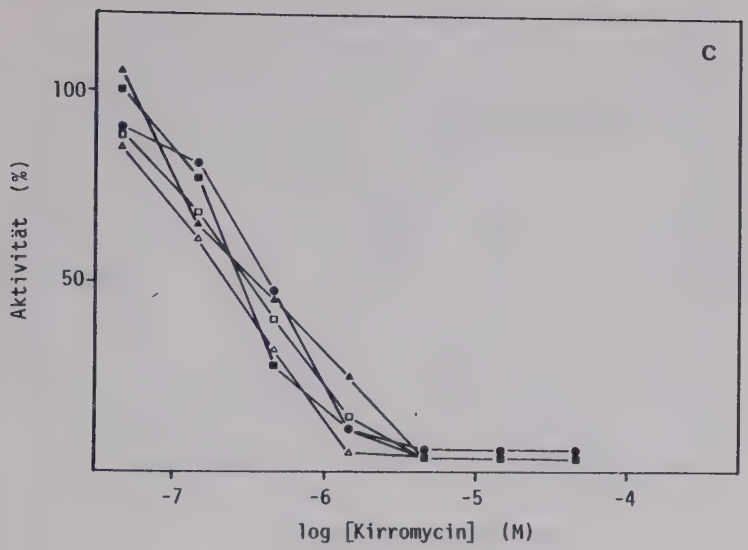
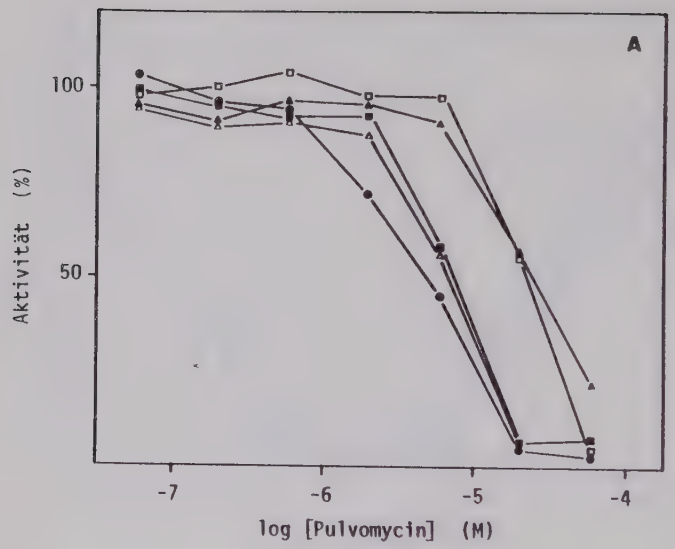


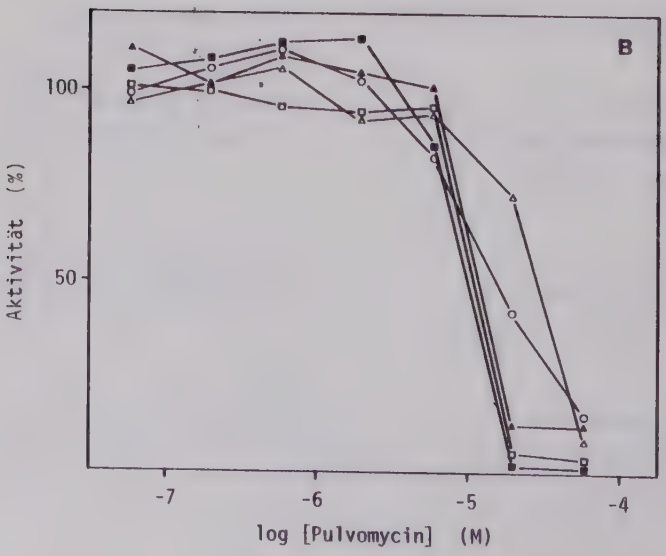
Abb. 1: Hemmung der zellfreien Proteinsynthese durch Kirromycin

(A)
E.coli MRE 600 (●)
S.viridochromogenes Tü 57 (■)
S.cinnamomeus Tü 89 (▲)
S.collinus Tü 365 (□)
S.diastatochromogenes Tü 1062 (△)

(B)
Sv.mobaraense Tü 1063 (○)
S.fradiae Tü 1222 (■)
S.goldiniensis ATCC 21386 (▲)
S.lactamdurans ATCC 27382 (□)
S.diastatochromogenes ATCC 31013 (△)

(C)
S.albus DSM 40652 (●)
S.ramocissimus ATCC 27529 (■)
S.fradiae Tü B108 (▲)
S.olivaceus Tü B10 (□)
S.diastatochromogenes Tü W289 (△)


A
100
50
Aktivität (%)
-7
-6
-5
-4
log [Pulvomycin] (M)


B
100
50
Aktivität (%)
-7
-6
-5
-4
log [Pulvomycin] (M)

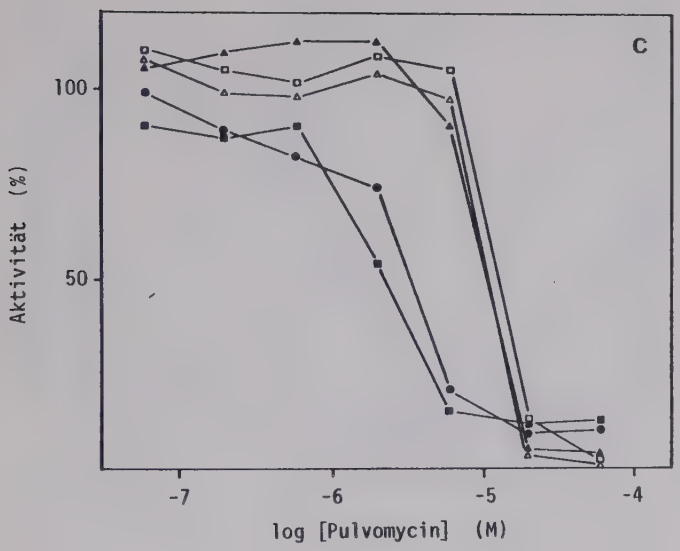


Abb. 2: Hemmung der zellfreien Proteinsynthese durch Pulvomycin

(A)

E.coli MRE 600 (●)
S.viridochromogenes Tü 57 (■)
S.cinnamomeus Tü 89 (▲)
S.collinus Tü 365 (□)
S.diastatochromogenes Tü 1062 (△)

(B)

Sv.mobaraense Tü 1063 (○)
S.fradiae Tü 1222 (■)
S.goldiniensis ATCC 21386 (▲)
S.lactamdurans ATCC 27382 (□)
S.diastatochromogenes ATCC 31013 (△)

(C)

S.albus DSM 40652 (●)
S.ramocissimus ATCC 27529 (■)
S.fradiae Tü B108 (▲)
S.olivaceus Tü B10 (□)
S.diastatochromogenes Tü W289 (△)

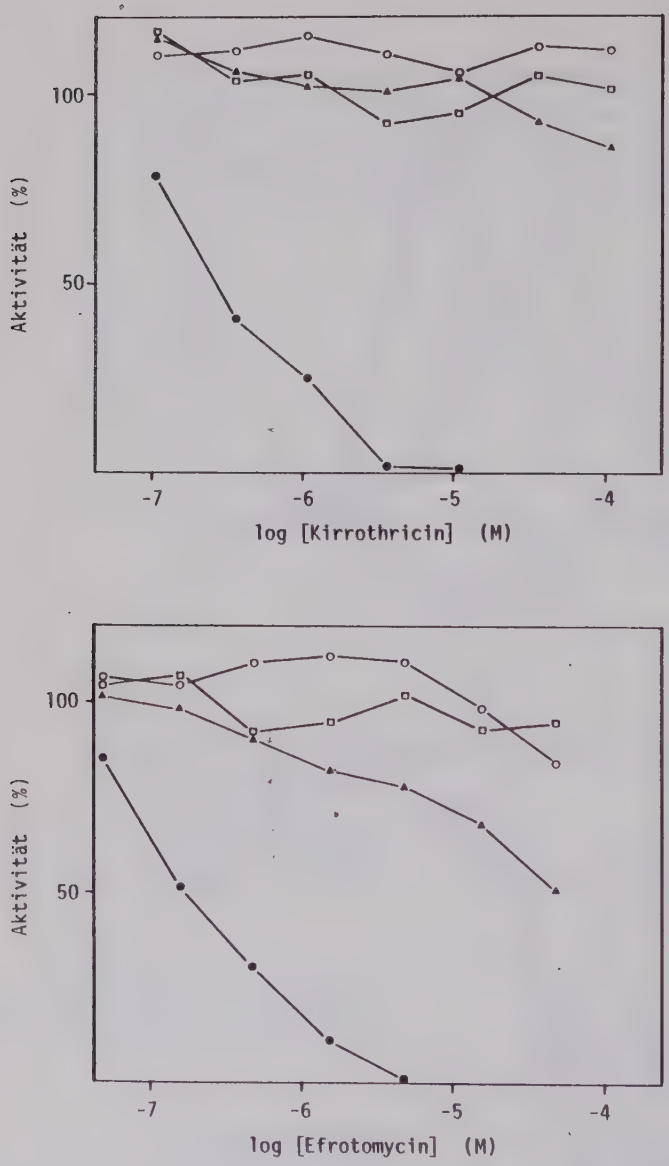


Abb. 3: Hemmung der zellfreien Proteinsynthese durch Kirrothricin bzw. Efrotomycin

E.coli (●), Sv.mobaraense (○), S.cinnamomeus (▲), S.lactamdurans (□)

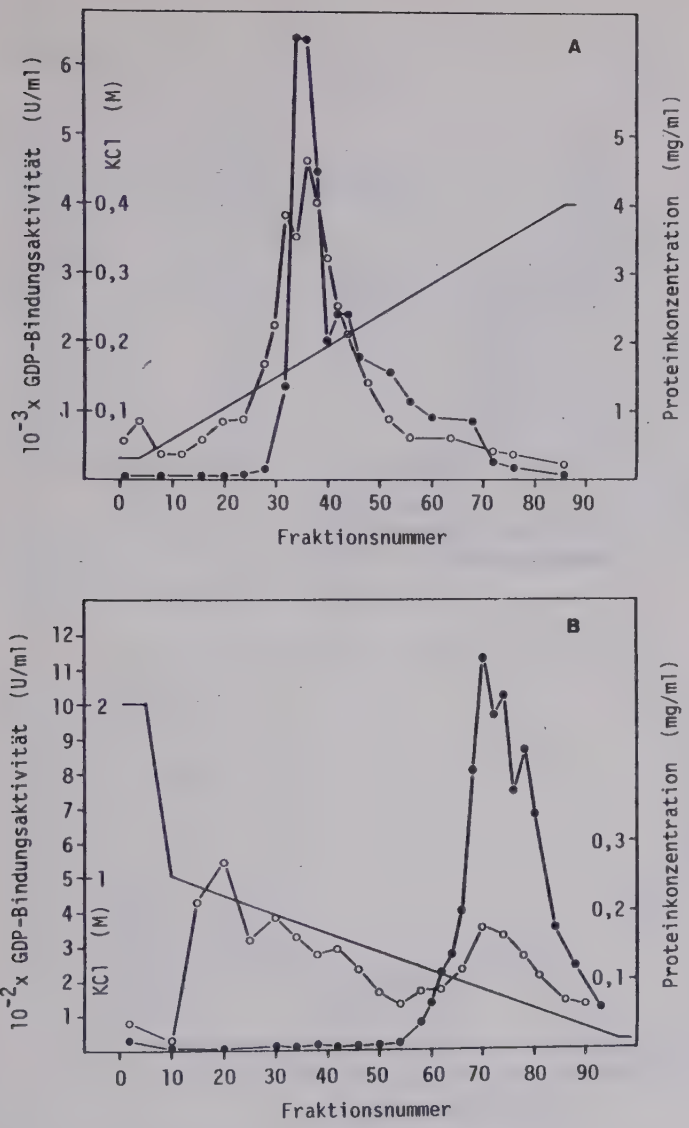


Abb. 4: Reinigung von EF-Tu aus S.cinnamomeus

(A) DEAE-Sepharose, (B) Phenyl-Sepharose
GDP-Bindungsaktivität: EF-Tu·GDP und EF-Tu·EF-Ts (●), Proteinkonzentration (○),
KCl-Gradient: bestimmt über Leitfähigkeitsmessung (——)

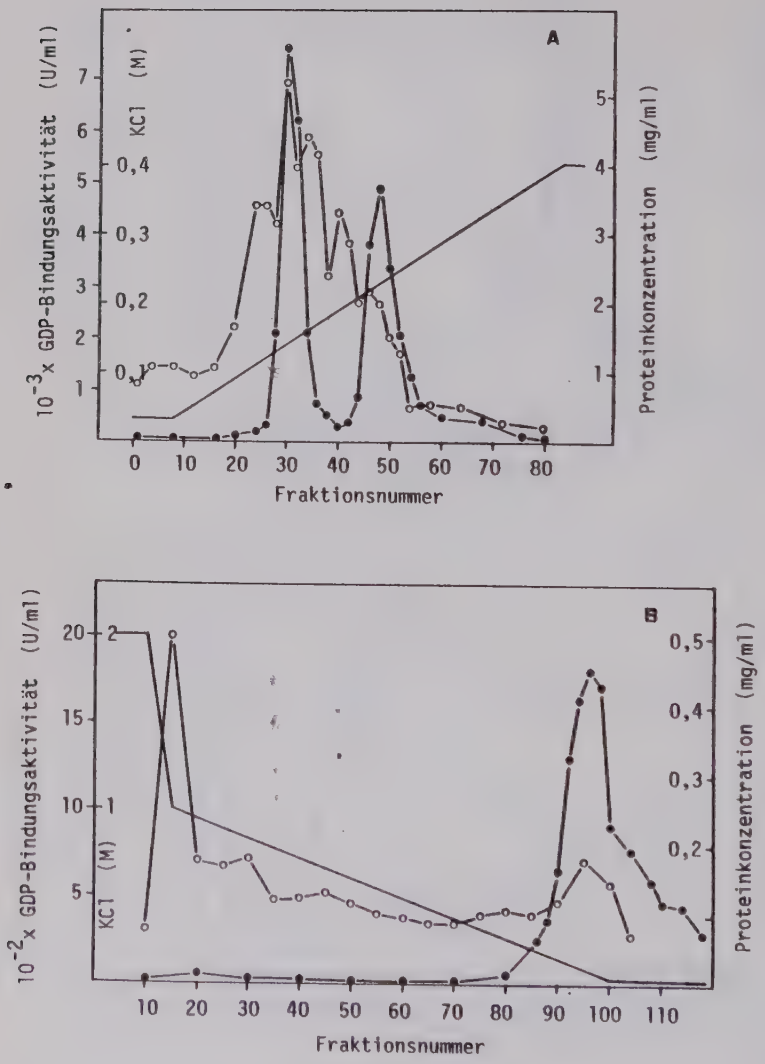


Abb. 5: Reinigung von EF-Tu aus S.lactamdurans

(A) DEAE-Sepharose, (B) Phenyl-Sepharose
GDP-Bindungsaktivität: EF-Tu·GDP und EF-Tu·EF-Ts (●), Proteinkonzentration (○),
KCl-Gradient: bestimmt über Leitfähigkeitsmessung (——)

Lebenslauf

Claudia Glöckner,
geboren am 9. Juli 1954 in Göppingen

April 1961 - März 1965	Albert-Schweitzer-Grundschule in Göppingen
April 1965 - Juni 1973	Mörike-Gymnasium in Göppingen
7. Juni 1973	Reifeprüfung
ab SS 1974	Studium der Biochemie an der Universität Tübingen
April 1975	1. Teil der Diplomvorprüfung in Biochemie
März 1977	2. Teil der Diplomvorprüfung in Biochemie
4. November 1981	Diplomprüfung in Biochemie

Ab Juni 1982 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I, der Universität Tübingen unter der Anleitung von Professor Dr. Heinz Wolf.

Akademische Lehrer:

E.Bayer, V.Braun, W.Braun, F.Gönnenwein, K.G.Grell, J.Guglielmi, R.Jacob, H.Krüger, H.Mauser, D.Mecke, K.Mörike, E.Müller, H.Pommer, H.Probst, H.Remmer, B.Schwemmle, W.Seyffert, J.Strähle, W.Voelter, U.Weber, G.Weitzel, A.Wendel, U.Weser, H.Wolf, H.Zähner